

زراعة الأنسجة والخلايا النباتية

أ.د. محمود عبد الحكيم محمود | قسم البساتين (جامعة المنيا، مصر)



الدار العربية للنشر والتوزيع الحديثة



١٦٥
٩٦
ن.ب



زراعة

الأنسجة والخلايا النباتية

مكتبة
الزراعة
٦٢ ١٢



GN:006312

BibID:12301900

582.82

96/

تأليف

الأستاذ الدكتور

محمود عبد الحكيم مح

قسم البساتين جامعة المنيا - مصر

حقوق النشر

زراعة الأنسجة والخلايا النباتية

تأليف

الاستاذ الدكتور/ محمود عبد الحكيم محمود

رقم الإيداع: ٢٣١٢٨ / ٢٠١٦

978- 977- 258- 424- 2

حقوق النشر محفوظة

لدار العربية للنشر والتوزيع الحديثة

٧٧ ب طريق النصر بجوار طيبة مول - مدينة نصر

ت: ٢٤٠٥٠٥٢١

E_mail: aldar_alarabial@yahoo.com

لا يجوز نشر أي جزء من هذا الكتاب، أو اختزان مادته بطريقة الاسترجاع أو نقله على أي وجه، أو بأي طريقة، سواء أكانت اليكترونية، أو ميكانيكية، أو بالتسجيل، أو بخلاف ذلك إلا بموافقة الناشر على هذا كتابة ومقدماتاً

زراعة الأنسجة والخلايا النباتية

أ.د. محمود عبد الحكيم محمود | قسم البساتين (جامعة المنيا، مصر)



زراعة الأنسجة والخلايا النباتية

أ.د / محمود عبد الحكيم محمود
قسم البساتين - كلية الزراعة
جامعة المنيا

مقدمة

يعتمد الإنسان على الزراعة في توفير احتياجاته الأساسية من الطعام والكساء. ومما لا شك فيه أن الزراعة التقليدية لا تبقى كما ولا نوعاً بحاجة الأعداد المتزايدة من البشر يوماً بعد يوم. وقد وضع الله سبحانه وتعالى أسراراً جلية في الخلية النباتية مكنت العلماء خلال العقدين الماضيين من تحسين إنتاجية المحاصيل الهامة لتتلاءم مع الكثير من المتطلبات الكمية والنوعية للإنسان. وذلك من خلال تطوير التقنية الحيوية واستخدامها في الزراعة، والتي يُعَلَّق عليها الكثير من الأمل في حل مشكلة الغذاء العالمي وخصوصاً في دول العالم النامي. ولأن زراعة الأنسجة هي إحدى الركائز الأساسية في التطبيق العملي للتقنية الحيوية، فإن هذا الكتاب يستهدف توضيح الأسس العلمية لزراعة الأنسجة والخلايا النباتية معملياً مع الإشارة إلى كيفية الاستفادة منها في المجال التطبيقي. دون إسهاب وقد خصص لذلك كتاب آخر وعلى الرغم من حداثة النسبية لعلم زراعة الأنسجة فقد خرج سريعاً من عباءة البحوث المعملية إلى رحابة العمل التجاري. فبعد عدة عقود من محاولة العلماء تطوير هذا العلم أصبح الإكثار الدقيق في الدول المتقدمة من الطرق الروتينية لإكثار العديد من النباتات الهامة بكميات كبيرة وبمواصفات جيدة. وبات من اليقين وبالرغم من بعض المعوقات التي تحول دون التطبيق العملي للإكثار المعملية لبعض النباتات أن الإكثار الدقيق له من المميزات ما يؤهله لأن يكون بديلاً للطرق التقليدية لإكثار العديد من الحاصلات الزراعية. ولا يمكن التغاضي عن دور زراعة الأنسجة في تربية النبات وتحسين صفاته الوراثية والمحافظة على الأصول الوراثية من الإنثار.

وحتى يكون الكتاب أكثر فائدة لطلاب الدراسات العليا والمهتمين بالعمل التجاري تم الإشارة إلى حل الكثير من المشكلات المعملية وقد راعيت ذلك بالتفصيل في الباب الرابع والخامس بالحديث عن مشكلتي التلوث، والأقلية، واللذان قد تكونا سبباً في فشل برنامج الإكثار برمته. كما حرصت على إلقاء الضوء على الإسهامات الإبداعية والفكرية لبعض العلماء الذين ساهموا في تطوير هذا العلم، بهدف تشجيع طلاب الدراسات العليا على وجه الخصوص على التفكير فيما وراء المشاهدات الروتينية والنظريات العلمية. فعلى سبيل المثال كيف فكر ووفق أحد طلاب الدراسات العليا مع استاذاه في تكوين أهم وسط مستعمل في مزارع الأنسجة حتى الآن، وكيف أدرك بتجربة بسيطة في إجرائها عميقة في فكرها دور السيوكينينات في تنظيم النمو والتكثف.

وفي النهاية ما كان لهذا العمل أن يتم دون الاستفادة مما وفرتة الجامعة من مصادر إلكترونية اتاحت لى الإطلاع على الكثير من الكتب الحديثة، والعشرات من الدوريات العلمية المتميزة. ومن خلال الدروس العملية والعديد من الأبحاث كونت مكتبة من الصور الرقمية ساهمت فى توضيح وفهم العديد من المواضيع فى متن الكتاب. كما تم إلقاء بعض الضوء على هذه التقنية وأهميتها فى دعم وتوفير الغذاء، دون الخوض فى حذل قبول هذا أو رفض ذاك والتي قد يتسع لها كتاب آخر خاص بالتطبيقات العملية لزراعة الأنسجة والخلايا النباتية. والكتاب غنى بالمراجع الحديثة و المقالات المرجعية لكثير من المواضيع حتى يتسنى لطلاب الدراسات العليا الرجوع إليها فى حالة الرغبة للإستزادة.

وأتمنى من الله سبحانه وتعالى أن يكون هذا العمل المتواضع علماً نافعاً خالصاً لوجهه الكريم، وهو من وراء القصد.

أ.د/ محمود عبد الحكيم محمود

قسم البساتين- جامعة المنيا

إهداء

إلى روح والدي

فهرس المحتويات

الصفحة

الموضوع

مقدمة

الإهداء

فهرس المحتويات

الفصل الأول

التعريف بأنواع مزارع الأنسجة

٥	أنواع مزارع الأنسجة النباتية
٥	أولاً: مزارع الأنسجة المتكشفة أو مزارع الأعضاء
٨	ثانياً: المزارع غير المتكشفة
١٠	لمحة تاريخية
١٣	دورة الخلية وارتباط ذلك بزراعة الأنسجة
١٨	طرق الحصول على نباتات من مزارع الأنسجة
١٩	أهمية زراعة الأنسجة
٢١	مختبر زراعة الأنسجة

الفصل الثاني

مكونات بيئات النمو المستعملة في زراعة الأنسجة

٢٥	أولاً: المكونات غير العضوية
٣٠	أ- العناصر المغذية الكبرى
٣١	ب- العناصر المغذية الصغرى
٤٥	ثانياً: المواد العضوية
٥٧	أ- الفيتامينات
٥٨	ب- الأحماض العضوية
٦٠	ج- الأحماض الأمينية
٦١	د- السكريات كمصدر للطاقة
٦٣	هـ- المواد غير محددة التركيب في البيئة
٧١	ثالثاً: المواد المصلبة للبيئة
٧٢	رابعاً: الماء
٩١	خامساً: تركيز أيونات الهيدروجين
٩٣	سادساً: الضغط الاسموزي للبيئة
١٠٠	

١٠٦

١١٤

١١٥

تجهيز البيئة
اختيار البيئة المناسبة
إعداد البيئة

الفصل الثالث

منظمات النمو النباتية ودورها في زراعة الأنسجة

١٢٢

١٢٤

١٣٠

١٣٧

١٤٠

١٤٣

١٤٦

١٤٩

١٥١

١٥٢

١٥٤

١٦٣

١٦٤

١٦٩

١٧١

١٧٥

١٧٦

١٧٩

١٧٩

١٨١

١٨٧

١٩٠

١٩٢

١٩٣

١٩٤

١٩٨

أولاً: الأوكسينات

تأثير الأوكسينات في زراعة الأنسجة

تنظيم نشاط الأوكسين

دور المركبات الفينولية في النشاط الأوكسيني

تأثير الأوكسينات ومضادات الأوكسينات على مستوى الأكسين

ثانياً: السيتوكينينات

تأثير الأدنين في مزارع الأنسجة

التخليق الحيوي للسيتوكينينات

السيتوكينينات المصنعة

تأثير السيتوكينينات في زراعة الأنسجة

مضادات السيتوكينينات

التداخل بين الأوكسينات والسيتوكينينات

ثالثاً: الجبريلينات

دور الجبريلينات في زراعة الأنسجة

مضادات حامض الجبريليك، ومعوقات النمو والتطور

رابعاً: حامض الإبيسيسيك

خامساً: غاز الأثيلين

التخليق الحيوي ومثبطاته

إنتاج الإثيلين في مزارع الأنسجة وتأثيره عليها

سادساً: المركبات عديدة الأمين ومنظمات النمو الثانوية

دور المركبات عديدة الأمين في زراعة الأنسجة

سابعاً: أليجوسكريد

ثامناً: الإسترولات

تاسعاً: الفحم المنشط

عاشراً: الأثر الوظيفي للتجريح

الفصل الرابع

مراحل زراعة الأنسجة وبعض العوامل المؤثرة عليها

٢٠٢	
٢٠٨	العوامل المؤثرة على النمو والنكشاف في مزارع الأنسجة
٢١٠	أولاً: العوامل الوراثية
٢١٥	ثانياً: العوامل المتعلقة بالنبات الأم
٢١٥	مرحلة النمو
٢٢١	تأثير الجنس
٢٢٣	معاملة النبات الأم والأجزاء المفصولة قبل التعقيم
٢٢٥	الظروف البيئية التي ينمو فيها النبات الأم
٢٢٧	ثالثاً: العوامل المتعلقة بالمستأصل النباتي
٢٢٧	عمر المستأصل النباتي
٢٣١	موقع وحجم المستأصل النباتي
٢٣٤	طريقة زراعة المستأصل النباتي
٢٣٨	التنافس بين الميرستيمات المتكونة في المستأصل النباتي
٢٣٩	الجروح
٢٤٠	رابعاً: العوامل المتعلقة بالظروف البيئية
٢٤١	طبيعة البيئة
٢٥١	نوعية الأوعية
٢٥٥	الغازات
٢٦٠	الرطوبة النسبية
٢٦٢	الحرارة
٢٦٦	الضوء
٢٧٧	المجال الكهربى والمغناطيسى

الفصل الخامس

مرحلتى تأسيس المزرعة والأقلمة

٢٨١	
٢٨١	مرحلة تأسيس المزرعة المعقمة
٢٨٢	أولاً: تعقيم المستأصل النباتي
٢٩١	التلوث الداخلى للمستأصل النباتي
٢٩٨	ثانياً: تعقيم غرفة النمو والأدوات والزجاجيات
٣٠١	ثالثاً: تعقيم البيئة
٣٠٤	عزل وزراعة المستأصل النباتي

٣٠٥	المشاكل الحشرية فى معامل زراعة الأنسجة
٣٠٧	مرحلة الأقامة للظروف الطبيعية
٣١٢	إنتاج نباتات ذاتية التغذية الضوئية

الفصل السادس

الإكثار الدقيق وزراعة الأعضاء والأنسجة النباتية

٣٢٧	الإكثار الدقيق
٣٢٩	طرق الإكثار المعملية
٣٣٣	أولاً: إكثار النباتات عن طريق قمع الأفرع والبراعم الجانبية
٣٣٥	زراعة القمم الميرستيمية وإنتاج نباتات خالية من الفيروس
٣٣٦	زراعة القمم النامية
٣٤١	زراعة العقد الساقية
٣٤٦	تكوين الأفرع من البذور
٣٥٠	ثانياً: الكشف المباشر
٣٥١	ثالثاً: الكشف غير المباشر فى مزارع الكالوس
٣٥٨	رابعاً: الكشف غير المباشر فى المعلق الخلوى
٣٧٠	خامساً: البذور المصنعة
٣٧٨	سادساً: الإكثار باستعمال الأجزاء المخزنة للغذاء
٣٨٢	سابعاً: مزارع المتك وإنتاج النباتات الأحادية
٣٨٤	ثامناً: التلقيح والإخصاب فى أنابيب الاختبار
٣٩٧	تاسعاً: زراعة الأجنة
٤٠٣	عاشراً: عزل وزراعة البروتوبلاست
٤٠٦	دمج البروتوبلاست وإنتاج الهجن الجسدية
٤٢٢	

الفصل السابع

التغيرات المظهرية والوراثية فى زراعة الأنسجة

٤٣٣	أولاً: التباين المؤقت
٤٣٩	ثانياً: التغيرات الوراثية الموروثة
٤٤١	مصدر التغيرات الوراثية فى زراعة الأنسجة
٤٤٣	أنواع التغيرات الوراثية الحادثة فى زراعة الأنسجة
٤٤٩	أسباب التباين الحادث فى زراعة الأنسجة
٤٥٥	استخدام التباينات الجسدية فى الانتخاب المعملية
٤٦٤	الاستفادة من النباتات المتباينة وراثياً
٤٦٧	

١٧٠
١٧٥
١٧٢

التفسير أو شرحها في النسخ المطبوع في المطبوعات القديمة من زراعة الأسماك
فائدة المراجع
قائمة المصطلحات

الفصل الأول

التعريف بمزارع الأنسجة

علم زراعة الأنسجة هو ذلك العلم الذي يهتم بتسمية الخلايا والأنسجة والأعضاء النباتية المستأصلة من النبات الأم على بيئة اصطناعية تحت ظروف تعقيم في المعمل. ويعتبر Schleiden & Schwann أول من وضع الأساس العلمي لزراعة الأنسجة، وبالتالي التقنية الحيوية وإنتاج النباتات المحورة وراثياً. وذلك عندما اكتشفا النظرية الخلوية Cell theory والتي تفيد أن الخلية هي وحدة النبات الحي وأن نمو النبات يعني تكوين مزيد من الخلايا. وقد طرحا نظريتهما للكشف الذاتي totipotency في سنة ١٨٣٨ وهي تعنى ببساطة القدرة الوراثية الكامنة للخلية على تكوين جميع أنواع الخلايا النباتية الأخرى أو نبات كامل تحت ظروف معينة. وفي العام التالي أعلن Schwann أن الحيوانات تتكون أيضاً من وحدات بنائية هي الخلية. ومن الغريب أن نظرية تركيب الكائن الحي من وحدات تعرف بالخلية اهتمت لفترة تصل إلى عقدين من الزمن. بل أن نظرية Schleiden واجهت اعتراضات كثيرة جداً لدرجة أنه أصيب بالاحباط واقلع عن العمل في هذا المجال. أما نظرية قدرة الخلية على تكوين فرد كامل فقد أكدت صحتها بعد ذلك بفترة طويلة جداً وبالتحديد في عام ١٨٧٨ عندما أثبت Herman Vochting عملياً أن الأجزاء الصغيرة جداً من أنسجة النبات يمكن أن تنمو تحت ظروف خاصة.

أما التحقق الكامل لهذه النظرية فكان في عام ١٩٥٤ عندما استطاع Muir مع فريقه البحثي من إنتاج أول كالوس ونبات بزراعة خلية فردية وبتقنية المزرعة الحاضنة. وكانت البداية الفعلية لهذا العلم في بداية التسعينيات من القرن التاسع عشر عندما نشر العالم الألماني Haberlandt نتائج محاولاته الأولى لزراعة خلايا كلوربلاست بعض النباتات الزهرية على بيئة غذائية تتكون من سكر الجلوكوز والبيتون وأملاح محلول Knop المغذى ونشر ذلك في بحث بعنوان "Experiments on the culture of"

'isolated plant cells'. وعلى الرغم من فشل هذه المحاولات فى الحصول على انقسام خلوى وزيادة عدد الخلايا بسبب التلوث، وعدم توفيقه فى اختيار أنسجة ملائمة لهذا الغرض إلا أنها كانت بمثابة بداية لتجارب أخرى ساهمت فى تقدم زراعة الأنسجة. وكان من استنتاجاته الهامة فى ذلك المضممار أن استعمال لبن جوز الهند ربما يساعد فى نمو الأنسجة المفصوله عن النبات الأصلي، وبالفعل كان لهذه الملاحظة تأثير فعال فى تطور زراعة الأنسجة بعد ذلك ومن الغريب أنه حتى الآن وبالرغم من التطور الكبير فى طرق التعقيم وتركيب بيئات ذات محتوى مناسب للعديد من صور النمو والتكشف للكثير من النباتات فما زال من الصعب دفع الأنسجة التى استعملها Haberlandt فى تحريكه للنمو والتكشف. وكانت إشارته والتى لم تعتمد على تجارب مؤكدة إلى قدرة الخلية على تكوين نبات كامل تحت ظروف خاصة هى بداية علم زراعة الأنسجة.

وقد كان تفكيره سابقاً عصره بما يقرب من قرن من الزمن حيث توقع فى ذلك الوقت أنه لن يكون من الغريب الحصول على جنين من خلية جسدية! فقد ترجم Vasil (2008) قوله *"To my knowledge, no systematically organized attempts to culture vegetative cells from higher plants in simple nutrient solutions have been made. Yet the results of such culture experiments should give some interesting insight into the properties and potentialities which the cell as an elementary organism possesses ...I am not making too bold a prediction if I point to the possibility that, in this way, one should successfully cultivate artificial embryos from vegetative cells"* ونجح Kotte فى عام ١٩٢٢ فى عزل وزراعة القمة النامية لجذور الذرة، لكنه فشل فى تقسيم وإعادة زراعة الجذور الناتجة، وهو ما نجح فيه Robbins فى نفس العام، لكن ماتت المزرعة بعد ذلك. وقد اعاق وجود وسط غذائى مناسب لنمو الأجزاء والأعضاء النباتية المختلفة تطور زراعة الأنسجة لفترة طويلة حيث استعمل الكثير من الباحثين

محلول Knop اعتقاداً منهم أن حاجة الأنسجة المفصولة من العناصر الضرورية للنمو هي نفس حاجة النباتات في المزارع المائية. لكن بالطبع النباتات في المزارع المائية ذات قدرة على تخليق السكريات بعملية البناء الضوئي على العكس من النباتات في مزارع الأنابيب على الأقل في تلك الحقبة الأولى من زراعة الأنسجة.

أمكن في عام ١٩٣٨ زراعة الجذور المفصولة من بعض النباتات في بيئة معقمه بواسطة White. وواكب ذلك النجاح وبعده بعام واحد إمكانية تحول الخلايا المتكشفة إلى خلايا غير متكشفة تعرف باسم الكالس callus على يد كلا من Gautheret و Nobecourt و White. ويعتبر Hannig من الرواد الأوائل في زراعة الأنسجة حيث نجح في فترة الخمسينيات من القرن العشرين في عزل أجنة غير ناضجة من بعض النباتات التابعة للعائلة الصليبية وزراعتها في وسط مغذى للحصول على نباتات كاملة. وتبع ذلك تقدماً سريعاً حيث أمكن زراعة الخلايا الفردية لبعض النباتات وكذلك عزل البروتوبلاست وزراعته والتهجين بين أنواع نباتية مختلفة كان من الصعب إجرائه بالطرق التقليدية المعروفة في تربية النبات. وكان جُل التقدم الحادث في علم زراعة الأنسجة راجعاً لاكتشاف منظمات النمو النباتية خاصة الأوكسينات والسيتوكينينات ودورهما في التحكم في نمو وانقسام وتكثف الخلايا. وتعد عملية نقل الجينات من مصادر متباينة نباتية أو غير نباتية إلى الخلايا النباتية بطرق مختلفة ثم دفع تلك الخلايا إلى تكوين نباتات تحمل الصفة الجديدة أو ما يعرف بالنباتات المحورة وراثياً من أحدث تطورات هذا العلم والتي انجزت في عام ١٩٨٣. ولم يستغرق الأمر زمناً طويلاً نسبياً لزراعة النباتات المحورة وراثياً والناجمة من مزارع الأنسجة بشكل تجارى. حيث يشير James (2015) إلى الزيادة المضطردة في زراعة النباتات المعدلة وراثياً حتى وصلت ١٨٠ مليون هكتار (١٠٠٠٠ م^٢) في عام ٢٠١٥ موزعة في ٢٩ دولة.

ومنذ بداية الثمانينيات في القرن الماضي انتقل علم زراعة الأنسجة بوتيرة سريعة جداً من المجال الأكاديمي إلى المجال التطبيقي في الدول المتقدمة حيث تزايد عدد الشركات العاملة في هذا المجال والتي تنوعت بين مجرد إكثار النباتات إلى استخدامها في برامج التربية، وكذلك في إنتاج العقاقير الطبية معملياً. وقد قدر الإنتاج العالمي من الشتلات الناتجة بتقنية الزراعة في الأنابيب بحوالى ٥٠٠ مليون إلى مليار نبات سنوياً وباستخدام ما يصل إلى ٥٠ ألف صنف نباتي (Baran & Biswajit, 2005). ويوجد بالفعل في العديد من الدول العربية كمصر وسوريا والمملكة العربية السعودية بعض المؤسسات الحكومية والخاصة التي تعمل في مجال إكثار النباتات بتقنية زراعة الأنسجة لكن في عدد محدود من الأنواع النباتية أهمها الموز ونخيل البلح والفراولة وبعض نباتات الزينة.

يستعمل مصطلح tissue culture من الناحية الأكاديمية للدلالة على طرز متباينة من الزراعة المعملية أو ما يعرف بـ *In vitro culture* والتي تعنى حرفياً in a glass حيث أن الزراعة كانت تتم غالباً في أنابيب اختبار أو ما شابه ذلك وهو عكس *In vivo* الذى يعنى داخل الكائن الحى. وفي الحقيقة فإن مصطلح tissue culture يعنى زراعة الكالس فقط أو ما يعرف بـ callus culture دون باقى أنواع مزارع الأنسجة (George, 2008). وعموماً لا تشتمل زراعة الأنسجة بالمعنى الشائع زراعة الأنسجة النباتية فقط لكن تعنى أيضاً زراعة أى جزء تم فصله من النبات ويسمى المستأصل النباتي explant سواء كان خلية أو نسيج أو حتى عضو كامل.

ويجب الإشارة إلى أن الخلايا النباتية خاصة الميرستيمية وهى خلايا غير متميزة أو غير متكشفة non-differentiated لها القدرة على التشكيل أو التطور لتكوين نبات كامل على العكس من الخلايا الحيوانية. وربما تمتلك الخلايا المتميزة أو المتكشفة differentiated أى تلك التى لها شكل أو وظيفة فسيولوجية محددة القدرة -على الأقل من

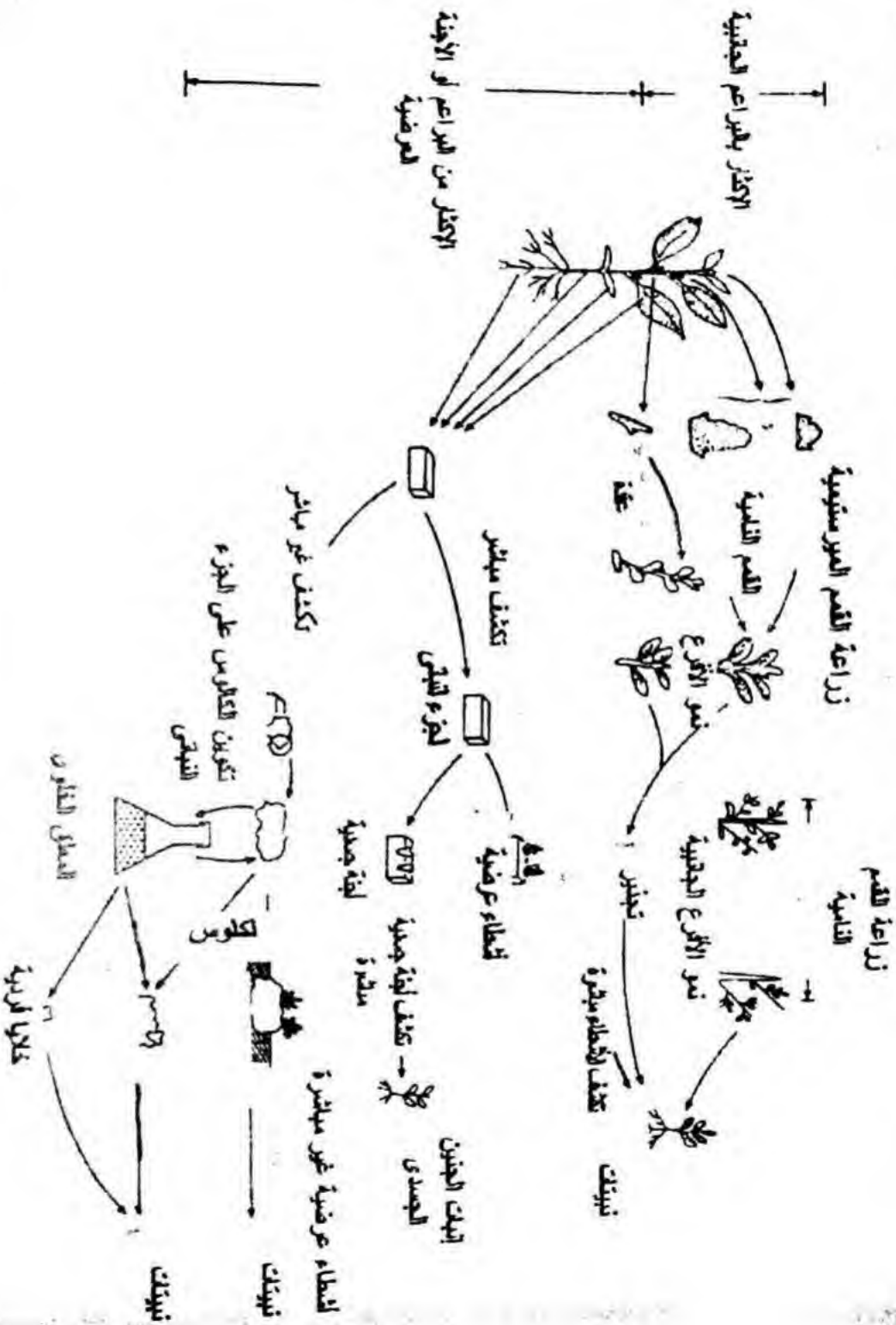
الناحية النظرية- على إعادة عملية التشكيل أو التطور مرة أخرى لكن بعد الارتداد إلى الحالة الميرستيمية طبقاً لنظرية totipotency. وقد يستعمل مصطلح micropropagation للدلالة على زراعة الأنسجة وإن كان يعنى الإكثار الدقيق فقط حيث يتم التعامل مع نباتات أو أجزاء غاية في الدقة. وفيما يلي عرض سريع لأنواع مزارع الأنسجة النباتية وسوف يتم الحديث عنها بالتفصيل في أجزاء أخرى من هذا الكتاب، والهدف من ذلك هو التعريف العام بها باعتبار أن ذلك أساسيًا في التعرض للأبواب التالية.

أنواع مزارع الأنسجة النباتية

هناك عدة أنواع من مزارع الأنسجة كما يبينها شكل رقم (١-١) ويتوقف الدافع من استعمال نوع محدد منها على الهدف المنشود من عملية الزراعة. فعلى سبيل المثال تستعمل زراعة القمم الميرستيمية بغرض الحصول على نباتات عديدة خالية من الفيروس، بينما تستعمل العقد الساقية لغرض الإكثار الدقيق، ومزارع المتك للحصول على نباتات احادية العدد الكروموسومى. وتقسم أنواع مزارع الأنسجة إلى نوعين أساسيين هما:

أولاً: مزارع الأنسجة المتكشفة أو مزارع الأعضاء Differentiated or Organized culture

وقد يطلق عليها أيضا المزارع المتميزة أو المتشكلة وهى تعنى زراعة أعضاء نباتية كاملة التكوين كالبراعم، والأجنة، والجذور أو أعضاء فى بدء تكوينها كالقمم النامية للسوق أو الجذور أو مبادئ الأوراق والأزهار وذلك بعد فصلها من النبات الأم أو عقب تكوينها من زراعة مستأصل نباتى آخر. والهدف من تلك المزارع هو دفع هذه الأجزاء لاستكمال نموها بنفس النمط كما لو كانت متصلة بالنبات الأم إما بغرض بعض الدراسات كمتبع عملية الإخصاب أو بغرض الإكثار ويضم هذا القسم عدد من الأنواع هي:



شكل ١-١: أنواع مزارع الأنسجة المستعملة لإكثار النباتات (معدل عن George, 1993)

١. زراعة القمم الميرستيمية Meristim culture: وهى عزل جزء صغير جداً من القمة النامية لا يتجاوز طوله ٠.٤ مم وعرضه حوالى ٠.١ مم مع واحدة أو اثنين فقط من مبادئ الأوراق، ولذا تصنف ضمن مزارع الأنسجة المتكشفة، وإن كانت بعض المراجع تصنفها ضمن المزارع غير المتكشفة وزراعته فى وسط غذائى معين ليعطى نباتاً واحداً غالباً. وتستعمل هذه الطريقة للحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية، وإكثار بعض النباتات الأخرى مثل الأوركيد. ويجب أن تستعمل زراعة الأنسجة فى النباتات المصابة بالفيروسات أو تلك المعروفة بحساسيتها العالية للفيروسات كالموز والبطاطس والداليا بزراعة القمم الميرستيمية مع إجراء اختبارات للتأكد من خلو النباتات الناتجة من تلك الفيروسات قبل استعمالها للإكثار المعملى بالطرق الأخرى.

٢. زراعة القمم النامية Shoot tip culture: وهى عزل جزء صغير من القمة النامية مع عدد قليل من مبادئ الأوراق وزراعته فى وسط غذائى ليعطى نباتاً واحداً أو أكثر بشرط أن تكون من براعم سابقة التكوين على النبات الأم. وبذلك تعتبر من طرق حفظ الأصول الوراثية. وتعد زراعة القمم الميرستيمية والقمم النامية من أكثر أنواع مزارع الأنسجة استعمالاً.

٣. زراعة العقد الساقية Stem node culture: وفيها يقسم الساق إلى عدة أجزاء يحتوى كل منها على عقدة بها برعم واحد أو أكثر فينمو كل برعم مكوناً ساقاً. وتستعمل طريقتى القمة النامية والعقد الساقية للإكثار التجارى للعديد من النباتات.

٤. زراعة الأجنة Embryo culture: وفيها يعزل الجنين عن اغلفة البذرة أو الثمرة فى مرحلة مبكرة بعد الإخصاب أو عقب تمام تكوينه ثم يكمل نموه ويعطى نباتاً. وتستعمل هذه الطريقة للتغلب على بعض المشاكل التى تؤدى إلى موت الجنين بعد عمليات التلقيح والإخصاب وكذلك فى تقصير دورة التربية لبعض النباتات. ويجب

عدم الخلط بين مزارع الأجنة والأجنة الجسدية حيث تتكون الأخيرة بعد زراعة المستأصل النباتي معملياً.

٥. زراعة الجذور Root culture: حيث تفصل الجذور وتزرع في وسط النمو وتستعمل هذه الطريقة غالباً للحصول على المواد الطبية الفعالة معملياً.

٦. زراعة المبايض والأزهار المفصولة Ovules and excised flowers culture: تفصل المبايض فقط أو الزهرة كاملة وتزرع في الوسط الغذائي بهدف التغلب على بعض المشاكل الناتجة عقب الإخصاب كسقوط الأزهار قبل تمام تكوين الجنين كذلك لإحداث الإخصاب المعمل.

٧. زراعة المتك Anther culture: وفيها يزرع المتك المحتوى على حبوب لقاح كاملة التكوين أو الخلايا الأمية لحبوب اللقاح microspores لتكوين أفراد أحادية التركيب الوراثي ويتم ذلك بتكوين أجنة جسدية أى جنين يشبه الجنين الحسى لكن بدون حدوث عمليتي التلقيح والإخصاب. وقد يحدث ذلك مباشرة من المستأصل النباتي أو تتكون النباتات بطريقة غير مباشرة عقب تكوين الكالس. وقد يتم زراعة حبوب اللقاح لنفس الغرض والتي تسمى pollen grain (microspore) culture. وربما يصنف البعض زراعة المتك على أنها من ضمن المزارع غير المتكشفة.

ثانياً: المزارع غير المتكشفة Non-differentiated or Non-organized culture

يتكون النبات الكامل من عدة أعضاء وكل عضو يتكون من مجموعه من الأنسجة المتخصصة من حيث الشكل الظاهري أو التشريحي أو الوظيفي، أى أن كل نسيج في العضو متحور للقيام بدور معين ويطلق على ذلك التحور عملية التكشف differentiation. فالورقة على سبيل المثال تتكون من عدة أنسجة كل نسيج يتكون من خلايا ذات مواصفات محددة ولكل منها شكل ودور محدد. وغالباً يندر وجود صور من

النمو غير المتخصص في الطبيعة ومن أمثلتها الأورام الناتجة عند إصابة بعض أنواع النباتات بأنواع من البكتيريا كمرض التدرن التاجي الناتج من الإصابة بكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*. لكن هذه الصورة من عدم الكشف شائعة في زراعة الأنسجة حيث تتحول الأنسجة المتكشفة إلى أنسجة غير متكشفة تعرف باسم الكالس *callus*. ولا يحتوى الكالس على تراكيب مميزة على الأقل في بداية تكوينه بل على عدد غير محدد من الخلايا غير المتكشفة والتي تشبه الورم. وقد يكون من الصعب المحافظة على نمو الخلايا المتكشفة في زراعة الأنسجة دون ارتدادها إلى الصورة غير المتكشفة أى الميرستيمية التى لها القدرة على النمو والانقسام لمدة طويلة في بيئة شبه صلبة أو سائلة. وبصورة عامة لا يفضل استعمال هذا النوع من المزارع فى عمليات الإكثار لتفادى حدوث تغييرات وراثية فى النسل الناتج، لكن لهذه المزارع أهمية كبيرة فى برامج التحسين الوراثي. ويضم هذا القسم عدة أنواع من مزارع الأنسجة وهى:

١. **زراعة الكالس Callus culture**: وهى زراعة ونمو كتل من الخلايا غير المتكشفة التى تنتج من نمو نسيج متكشف أو غير متكشف من عضو نباتي. وتستخدم هذه الطريقة فى انتخاب نباتات ذات صفات معينة وإنتاج معلق الخلايا.

٢. **زراعة معلق الخلايا Cell suspension culture**: وهى تشير إلى زراعة الخلايا فى صورة فردية أو كتل صغيرة منها فى وسط غذائى سائل مع ضمان وجود تهوية بطريقة ما لهذه المزارع. والغرض الأساسى من هذا النوع هو إنتاج المواد الفعالة أو الثانوية معملياً، بالإضافة لاستخدامها كوسيلة لانتخاب نباتات ذات صفات فريدة. ويعتبر Bergmann أول من استطاع الحصول على معلق الخلايا الفردية من نبات الدخان فى سنة ١٩٦٠.

٣. **زراعة البروتوبلاست Protoplast culture**: عبارة عن نزع الجدار الخلوى للخلية وزراعة الخلية عارية منه، فما يلبث أن يتم إعادة تكوين الجدار الخلوى

وانقسام الخلية لتكون الكالس الذى يمكن أن يتكشف منه الأشطاء أو الأجنة الجسدية. وتستخدم مزارع البروتوبلاست وهى من أحدث تقنيات زراعة الأنسجة فى إجراء التهجين بين أنواع نباتية يصعب التهجين بينها فى الطبيعة. وبالفعل نجح العديد من العلماء فى الحصول على هجن نوعية جديدة وهجن من نباتات عقيمة كالنباتات إحادية وثلاثية العدد الكرموسومى. ولزراعة المعلق الخلوى والبروتوبلاست أهمية كبيرة فى دراسة فسيولوجيا النبات وعلاقة الأمراض والطفيليات المختلفة به وكذلك عمليات النقل الجينى والتحول الوراثى Transformation للحصول على أفراد تحمل صفات ربما من أصل غير نباتى.

لمحة تاريخية

بعد هذا التعريف السريع لأنواع مزارع الأنسجة يجدر بنا إلقاء الضوء على التطور التاريخى لعلم زراعة الأنسجة والإشارة إلى بعض العلماء الذين ساهموا فى تقدم هذا العلم (جدول رقم ١-١). ولمزيد من المعلومات حول هذا الموضوع رأى من زراعة الأنسجة والمصطلحات الأساسية الخاصة بتعريف زراعة الأنسجة يمكن الرجوع إلى بعض الكتب والمقالات المرجعية مثل (Pierik (1987 و George (1993 و (2005) Baran & Biswajit و Vasil (2008) وكذلك الموقع www.kitchenculturekit.com/history_TC.htm على شبكة المعلومات الدولية. أما زراعة الأنسجة كلبنة أساسية فى التقنية الحيوية فقد تناولها (Gamborge (2002

وعموماً يمكن دفع الأنسجة فى الزراعة المعملية إلى تكوين أعضاء جديدة لم تكن موجودة بالأصل والتي تعرف بالأعضاء العرضية adventives أو adventitious وذلك عبر التحكم فى نشاط الجينات المنوط بها دفع الخلية للتكشف. ويطلق على هذه العملية التكوين الشكلى Morphogenesis أو تكوين الأعضاء Organogenesis. ويطلق على عملية التكوين الشكلى للأشطاء من الكالس Caulogenesis أما تكوين الجذور

فيعرف Rhizogenesis. وأحيانا نلاحظ تكوين أوراق عرضية من الكالس دون تكوين الأشرطة لكن إعادة تشكيل الأوراق تعنى تكوين القمم الميرستيمية التي ربما فشلت في النمو. وقد يرتبط تكشف الخاية بتطور العضو الموجودة به وعند ذلك يكون الفعل الجيني المسنول عن تطور العضو أساسيا لتكشف الخلية. فعلى سبيل المثال اللون المميز للأزهار مرتبط بحدوث تطور العضو الزهري، فلو أعيق تطور البرعم الزهري لأى سبب من الأسباب فلن يحدث تحول فى لون البلاستيدات المسنولة عن التلوين.

جدول ١-١: بعض الملامح الأساسية فى تطور علم زراعة الأنسجة.

العام	الباحث	الإسهام
١٩٠٢	Haberlandt	أول محاولة لزراعة الأنسجة
١٩٠٤	Hannig	نجاح زراعة الأجنة لبعض النباتات
١٩٢٢	Robbins	نجاح زراعة قمم الجذور
١٩٣٣	Nobcourt & White	النجاح فى الحصول على كالوس مستمر فى النمو
١٩٤٢	Gautheret	ملاحظة إنتاج المركبات الثانوية فى مزارع الخلايا
١٩٤٤	Skoog	دراسة تكشف البراعم العرضية للدخان معمليا
١٩٤٥	Loo	زراعة القمة النامية لنبات الأسبرجس
١٩٤٦	Ball	الحصول على أول نبات كامل من زراعة القمة النامية لنباتات <i>Lupinus</i> و <i>Tropaeolum</i>
١٩٤٨	Shoog & Tsui	إثبات أن الأكسين/الأدينين عامل هام فى تكشف البراعم والجذور فى أوراق الدخان
١٩٤٩	Nitsch	زراعة الثمار كاملة
١٩٥٢	Morel & Martin	إنتاج نباتات <i>Dahlia</i> خالية من الفيروس باستعمال القمة الميرستيمية
١٩٥٣	Tulecke	الحصول على نباتات <i>Ginkgo</i> أحادية بزراعة حبوب اللقاح
١٩٥٤	Muir et al.	إنتاج أول نبات من خلية فردية
١٩٥٥	Miller et al.	اكتشاف دور الكينيتين فى الانقسام الخلوي
١٩٥٧	Skoog & Miller	اكتشاف دور الأوكسينات/السيتوكينينات فى تنظيم تكشف البراعم والجذور

تابع جدول ١-١

الحصول على جنين لاجنسى من زراعة نسيج النيو سيلا	Maheshwari & Rangaswamy	١٩٥٨
النجاح فى إحداث الإخصاب فى أنبوبة اختبار	Kanata	١٩٦٠
إكثار الأوركيد بالقلم الميرستيمية	Morel	١٩٦٠
تحضير أكثر البينات استعمالاً فى زراعة الأنسجة	Murashige and Skoog	١٩٦٢
إنتاج أول نبات أحادى بزراعة حبوب لقاح الداتورة	Maheshwari & Guha	١٩٦٤
أول محاولة ناجحة لدمج البروتوبلاست	Power et al.	١٩٧٠
الحصول على نبات ذرة مقاوم لفطر الذبول بزراعة الكالس	Gengenbach & Green	١٩٧٥
التهجين الجسدى بين الطماطم والبطاطس	Melcher et al.	١٩٧٨
استحداث مصطلح التغيرات الجسمية	Scowcroft & Larkin	١٩٨١
إدخال الحامض النووى البلازميدى إلى الخلية	Paszkowski et al.	١٩٨٤
استعمال <i>Agrobacterium</i> لتحويل انبثات وراثياً	Horsh et al.	١٩٨٥

وفى حالة استخدام زراعة الأنسجة لإنتاج بعض المركبات الثانوية يكون من الضروري حدوث تكشف للخلايا بل وتكوين أعضاء كاملة إذا كان تخليق تلك المركبات يتم فى ذلك العضو. ويلاحظ أن الخلية فى زراعة الأنسجة توجد فى ظروف بيئية خاصة مختلفة تماماً عن تلك الموجودة فى الظروف العادية، فالخلية فى النبات النامى فى الظروف الطبيعية تكون متأثرة بدرجة عالية بالنظام الوراثى المتحكم فى الصفة والموجود ضمن الجينوم، بالإضافة إلى وجود اتصال بين الخلايا فى النسيج الواحد عن طريق الخيوط البلازموذمائية. وبالتالي تتأثر الخلايا ببعضها البعض، فالمركبات الهامة فى النمو والتطور كهرمونات النمو لا تخلق فى كل الخلايا بل فى خلايا محددة وتنتقل خلال النبات بطرق مختلفة لتؤثر فى خلايا أخرى. أما فى المعلق الخلوى بالتحديد ونظراً لوجود الخلايا بصورة غير مترابطة والحركة المستمرة للمعلق الخلوى بغرض التهوية فإن تأثر الخلية بالخلايا المجاورة ينخفض. أضف إلى ذلك أن الظروف البيئية تكون

مختلفة مما يؤثر في النظام الوراثي المتحكم في عمليات النمو والتكيف طبقاً للقاعدة المعروفة بأن الطرز المظهرى هو محصلة الطرز الوراثى والظروف البيئية والتفاعل بين الإثنين.

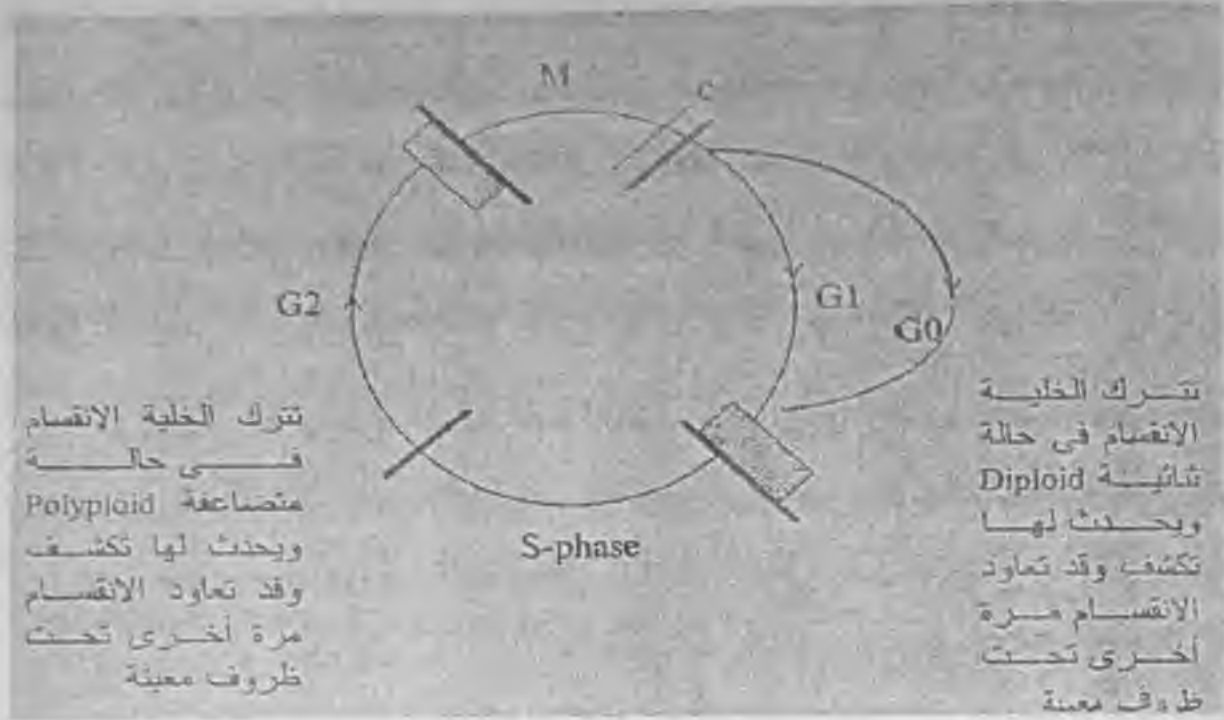
وبهذا يتضح أنه قد توجد صعوبة في المحافظة على الكشف الموجود في النسيج في زراعة الأنسجة. فمثلاً أمكن المحافظة على خلايا الميزوفيل الموجودة في كلوربلاست الخلايا البرانشيمية لبعض النباتات في هذه الصورة المتكشفة من حيث الحجم والشكل واللون لمدة ١٦٨ ساعة فقط، وبعدها أصبحت الكلوروبلاستيدات شاحبة وتوزيعها غير منتظم وبدأت الخلايا في الانقسام أى الارتداد إلى الحالة غير المتكشفة. كما أن الخلايا المتكشفة معملياً قد لا تتشابه مع الخلايا المقابلة لها في النباتات العادية. فرغم أن الأوراق المتكونة في زراعة الأنسجة تحتوى على خلايا الثغور لكن هذه الثغور لا تقوم بالدور المعروف في النبات الطبيعى، كذلك قد تكون الجذور المتكونة على النباتات معملياً غير فعالة وظيفياً (Chandaret *et al.*, 2010).

دورة الخلية وارتباط ذلك بزراعة الأنسجة

بالرغم أن هناك العديد من التعريفات التى تدور حول النمو لكن من الثابت أن النمو في النباتات الراقية يتم بزيادة عدد الخلايا أو حجمها أو كليهما معاً. وقد لا يكون هناك حد فاصل بين هاتين العمليتين ففي مناطق القمم النامية يحدث انقسام الخلايا في بضع مليمترات من القمة النامية والتي يليها منطقة الاستطالة حيث تزيد الخلايا في الحجم. أما في الأعضاء النباتية كالأوراق واللحاء فإن عمليتي الانقسام والاستطالة تحدثان في نفس المكان وقد تتزامنان. وتتم الخلية أثناء الانقسام بعدة مراحل هي M , $G1$, S , $G2$ (الشكل رقم ١-٢). وتؤدي كل مرحلة من هذه المراحل إلى حدوث المرحلة التالية، وتتكرر هذه المراحل في كل دورة من دورات الانقسام الخلوى. وتعرف الفترة التى تستغرقها الخلية من بداية الانقسام حتى نهاية الانقسام الثانى بدورة الخلية.

تنقسم الخلية انقساماً ميتوزياً (M) mitosis ينتج عنه غالباً خليتين متشابهتين. وقبل أن تنقسم الخلية مرة أخرى تمر بمرحلة تسمى مرحلة التهيؤ الأول (G1) gap1 ويسمى (post-mitotic interphase) وخلال هذه الفترة يتم معظم النمو الضروري لعضيات الخلية المختلفة وكذلك السيتوبلازم. وتعود هذه العملية إلى مرحلة أخرى تسمى مرحلة التخليق (S) synthesis حيث يتم خلالها تضاعف محتوى الخلية من المادة الوراثية المعروفة بالحامض النووي الديوكسي ريبوز DNA وبنهاية هذه المرحلة يكون كل كروموسوم مكون من كروماتيدتين واضحتين. وبعد طور التخليق تأتي مرحلة التهيؤ الثانية وتسمى (G2) post-synthetic gap2 قبل أن تدخل الخلية في الانقسام الميتوزي مرة أخرى وفي الظروف الطبيعية يكون زمن كل مرحلة من المراحل S و M و G2 ثابتاً أما الزمن الذي تستغرقه الخلية في المرحلة G1 فهو متباين.

وتفترض إحدى النظريات المفسرة لدورة الخلية أن هناك نقاط تحكم أساسية في هذه الدورة، ويتم تخليق المواد المتحكم في تلك النقاط في المرحلتين G1 و G2. وتتوقف الخلية عن الانقسام في هاتين المرحلتين إذا كانت هذه المواد غير كافية. وبإعادة تخليق هذه المواد مرة أخرى تعاود الخلية الانقسام من جديد ويكون دور زراعة الأنسجة آنذاك هو العمل على استحداث تكوين تلك المواد في الخلايا التي تحولت إلى الحالة المتكشفة. ويتوقف انقسام الخلية تنشيط العمليات الدافعة للتكشف وتكوين أعضاء جديدة. ويفترض البعض أن الخلية التي دخلت في مرحلة التكشف تتوقف عن النمو في مرحلة تعرف بـ G0 والتي قد تحدث قبل أو عقب الانقسام الميتوزي فإذا حدثت بعده تكون الخلايا ثنائية العدد الكروموسومي أما إذا حدثت بعد طور التهيؤ الأول وقبل الانقسام الميتوزي مباشرة فإن الخلية ستكون متضاعفة العدد الكروموسومي. والمفترض أن تسبق هذه المرحلة مرحلة الطور اللاجي (lag) الذي يؤهل الخلية للدخول في مرحلة التخليق.



شكل ٢-١: دورة خلية الكائنات الراقية بدءاً من الطور الميتوزي (M-) Mitosis ثم Cytokinesis (C) ويليه (G1) post-mitotic interphase و (G2) post-synthetic interphase أما S-phase فهي مرحلة تخليق الحامض النووي. تشير الأجزاء المظلمة إلى الأماكن الأساسية لتحكم البروتين في الدورة (Francis & Sorrell, 2001).

ويحتاج التكشف لتخليق الـ DNA الموجود في النواة والعضيات الأخرى، فإن كان هناك انقساماً خلوياً سابقاً فإن هذا التخليق يحدث في طور الـ S-phase. أما في حالة حدوث التكشف دون الانقسام فإن تخليق المادة الوراثية يتم عن طريق التضاعف الذاتي amplification و endopolypliodisation للجينات المسنولة عن هذا التكشف. وهناك بعض الصور من التطور للأعضاء كتكوين عناصر الخشب الناقصة Tracheids التي تتم بحدوث تضاعف في عدد الكروموسومات والمادة الوراثية دون انقسام النواة لعدم تكون خيوط المغزل ويعرف ذلك بالتضاعف الداخلي endoreduplication أو endopolyploidy أو endomitosis. والجدير بالذكر أنه إذا استعملت أنسجة محتوية على خلايا بها هذه الصور من التضاعف فإن النباتات التي ربما تتكشف منها ستكون

محتوية على هذا التضاعف. لكن لا يرتبط العديد من صور تكشف الخلايا بالاستطالة وتكوين الأزهار وتغير لون البلاستيدات بالقسام الخلايا، حيث يحدث الكشف في بضع مليمترات من الخلايا دون الحاجة إلى الانقسام. فمثلا السيويرين يتكون في خلايا درنات البطاطس عند جرحها، وكذلك الأوعية الناقلة تتكون في الأنسجة دون الحاجة إلى انقسام الخلايا.

ويلاحظ أن بعض الخلايا عالية التخصص تبدو وكأنها فقدت القدرة على الارتداد إلى الحالة الميرستيمية أى عدم الكشف مرة أخرى وبذلك فقدت القدرة على تكوين نبات جديد. ويطلق على الخلايا التى لها القدرة على الكشف لعضو ما كأن تكون أشطاء أو جذور أو أجنة جسمية بأنها خلايا مؤهلة competent cells وقد تكون الخلية مؤهلة للكشف لعضو محدد من الأعضاء السابقة دون الآخر وتسمى الخلية فى هذه الحالة بالخلية المحددة determined cell. فخلايا القمم الميرستيمية للسوق مؤهلة لأن تتكشف إلى خلايا ساق أما خلايا القمم الميرستيمية للجذر فهى مؤهلة لأن تعطى خلايا جذر. لكن حتى وإن كانت الخلية مؤهلة للكشف فلا بد أن تتوفر الظروف التى تدفع الخلية للكشف كما سبق الذكر. ويمكن بالتحكم فى الظروف الخارجية تعديل تأهيل الخلية فيمكن للخلايا الميرستيمية المفصولة من القمم النامية للسوق أن تعطى جذور والعكس صحيح. وتلعب منظمات النمو خاصة الأوكسينات والسييتوكينينات معاً الدور الأعظم فى هذه العملية (Tao & Verbelen, 1996). ولكل مجموعة دوراً مكملًا للآخر فالأكسين يعمل على تضاعف الحامض النووى بينما للسييتوكينينات دوراً أساسياً فى عملية الانقسام الخلوى سواء فى النبات الكامل أو فى زراعة الأنسجة ولا تدخل الخلية فى الانقسام الخلوى إلا إذا توفرت السييتوكينينات. ويتطلب انقسام الخلايا تناسق بين طور التخليق (S) والانقسام الميتوزى (M) ومن ثم يجب ملاحظة مستوى كلا من الأوكسينات والسييتوكينينات بدقة فى بيئة زراعة الأنسجة فنقص الأوكسينات أثناء طور التهيو الثانى (G2) يسبب إيقاف انقسام معلق خلايا الدخان (Koenset al., 1995).

ويعمل منظم النمو 2iP على تقصير فترة طور التخليق بتقصير الفترة اللازمة لمضاعفة الحامض النووي. وللكينيتين دور في تنظيم عملية الفسفرة الضرورية لتخليق cycline-dependent kinase (Cdk) المتحكم في الانتقال من مرحلة التهيؤ الثانية إلى الانقسام. ويعتقد أن هناك ارتباطاً وثيقاً بين السيٲوكينينات والبروتينات المشتركة في تضاعف الحامض النووي في مرحلة التخليق. وقد وجد Suda *et al* (2009) أن إضافة ١٠ ميكرو لتر من منظم النمو السيٲوكينيٲي المعروف بالنزيرل ادنين تثبٲ انقسام معلق خلايا الدخان، حيث لم تدخل الخلايا في طور التهيؤ الثاني بعد المعاملة بساعات قليلة. كذلك تم ايقاف أو تعطيل (على أساس التركيز المستعمل) دورة الخلايا التي كانت في مرحلة الانقسام الميٲوزي. وقد سببت المعاملة موت بعض الخلايا بعد ١٦ ساعة من المعاملة. هذا وقد سُجل تأثير مختلف للسيٲوكينينات المختلفة على الانقسام والنمو في هذه الدراسة. والمنظمات النمو الأخرى دوراً في تنظيم دورة الخلية، فهرمون الزياتين يعمل على تنشيط بعض الجينات المتحكممة في الانقسام الخلوي ودورة الخلية في نبات Arabidopsis بطريقة تشبه فعل عامل النمو المعروف D cycline في الثدييات. وفي الأرز يعمل حمض الجبريلك (GA_3) على استطالة السلاٲميات وقد يرجع ذلك على الأقل جزئياً إلى دوره في تخليق Cdk أثناء الانتقال من مرحلة التهيؤ الثانية إلى الانقسام الميٲوزي، أما الدور المثبٲ لحامض الأبسيسك (ABA) على النمو فقد يرجع إلى تثبٲ تخليق Cdk. وللمزيد من المعلومات حول هذا الموضوع يمكن الرجوع إلى Dewitte *et al.* (2003).

وعلى الرغم من قدرة بعض منظمات النمو على إحداث التكشف المباشر للأعضاء إلا أن بعض الخلايا في بعض الأجزاء النباتية يكون تم تحديدها determination مسبقاً بصورة جزئية لتسلك مسلكاً معيناً من مسالك الكشف كان تتطور إلى أجنة جسدية، ومن ثم فإنها تحتاج لتغير بسيط في الظروف المحيطة لتبدأ الكشف. ويكون هناك احتمالاً عالياً للحصول على أجنة جسدية من هذه الخلايا بالتكشف

دون تكوين كالوس للنمو وتكوين أعضاء جديدة (شكل رقم ١-٣) أو أجنة جسدية. وتعد الطريقة المباشرة أكثر حفاظًا على ثبات التركيب الوراثي في الأفراد الناتجة. أما الطريقة غير المباشرة فيتم تكوين الأجنة الجسدية أو الأعضاء سواء الأشرطة أو الجذور بعد تكوين الكالس والذي يلاحظ غالبًا عقب زراعة المُستأصل النباتي في وسط يحتوى على تركيز مرتفع من الأوكسينات. أى يتم الكشف من براعم عرضية لم تكن موجودة على النبات الأم، وهذه الطريقة تساعد على حدوث تباين وراثي بين الأفراد الناتجة والأم. ويعتبر حدوث تباين وراثي في الأفراد الناتجة أحد عيوب أو مميزات الطريقة المتبعة للإكثار على أساس الغرض من زراعة الأنسجة. لكن من الناحية العملية وحتى في حالة إتباع الطرق التى تستخدم للمحاولة دون تكوين براعم عرضية فإن زراعة الأنسجة لا تضمن حدوث تكشف الأشرطة بالطريقة المباشرة فقط حيث يتم تكوين بعض البراعم العرضية وقد يصعب التمييز بين النباتات الناتجة من الكشف المباشر وغير المباشر.

أهمية زراعة الأنسجة

بعد التطور الكبير لعلم زراعة الأنسجة خلال القرن الماضى أصبح له الكثير من الفوائد سواء من الناحية الأكاديمية أو التطبيقية (Baran & Biswajit, 2005) ومنها:

١. دراسة عمليات الكشف والتطور وكذلك الأيض.
٢. دراسة تأثير الهرمونات والتداخل بين أنواعها المختلفة على الخلايا.
٣. دراسة دورة الخلية والتركيب الخلوى.
٤. استحداث الطفرات.
٥. دراسة العلاقة بين المسببات المرضية والنبات على المستوى الخلوى والنسجى والنبات الكامل.
٦. تعتبر طريقة ناجحة وسريعة واقتصادية لإكثار عديد من النباتات الاقتصادية، ويعتبر هذا من أكثر المجالات تطبيقاً.
٧. مصدر بديل عن الزراعة للحصول على المواد الطبية النباتية معملياً بل أمكن استخدام النباتات كالدخان والموز والبطاطس فى إنتاج بعض الأمصال.



ب



ا

شكل ١-٣: نمو البراعم الأبطية الموجودة على المستأصل النباتي لتعطي نباتات مطابقة للنبات الأم في نبات *Juniperus communis* (أ)، وتكشف البراعم العرضية مباشرة دون تكوين الكالس في نباتات *Ruta graveolens* (ب)، وخليط من التكشف المباشر وغير المباشر في نفس النبات (ج).



ج

٨. زراعة الأنسجة هي النواة الأساسية لتجارب الهندسة الوراثية ونقل الجينات. فالهندسة الوراثية تقوم بتحويل الخلايا بإدخال الجين المستهدف إليها، لكن لا بد من زراعة الخلية في معلق خلوي أو دفع تلك الخلية لتكوين نبات ليعبر به الجين المستهدف عن نفسه وهذا هو دور زراعة الأنسجة.
٩. إنتاج نباتات خالية من الأمراض خاصة الأمراض الفيروسية.

١٠. نقل الأصول الوراثية والنباتات من مكان إلى آخر بسهولة وتجنب نقل مسببات المرضية المصاحبة لها.

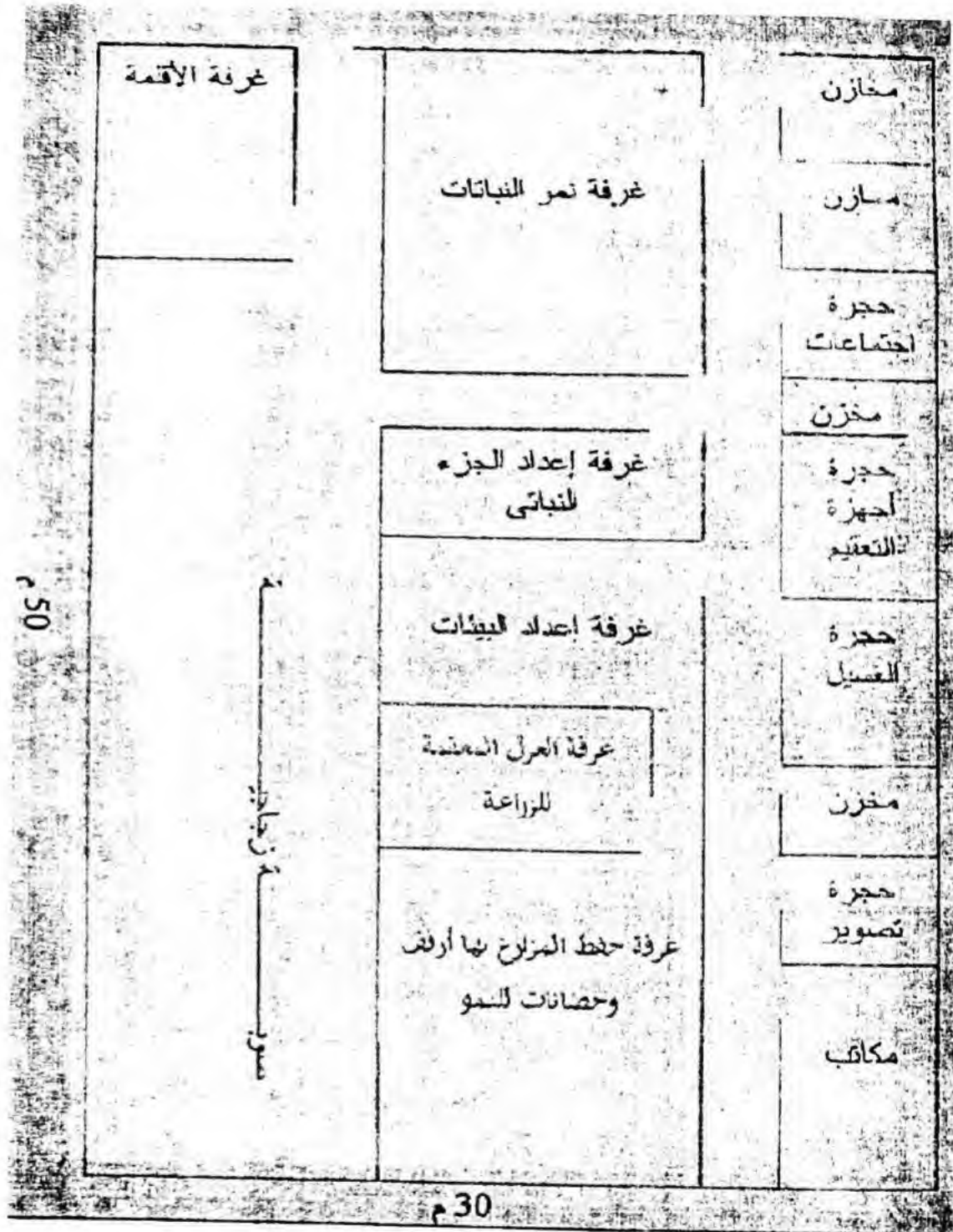
١١. استخدامها في تربية النبات في المجالات الآتية:

- إجراء بعض التهجينات التي يصعب إجرائها بالطرق التقليدية أو على الأقل المساعدة في إنجازها.
- حفظ الأصول الوراثية وقد أمكن التغلب على الكثير من المعوقات التي واجهت البنوك الوراثية.
- إحداث تباين وراثي في العشيرة والانتخاب داخلها وخاصة في النباتات خضرية التكاثر كمعظم نباتات الفاكهة والزينة وبعض المحاصيل الأخرى. ويعتبر أحداث التباين من الخطوات الأساسية في برامج التربية.
- إنتاج نباتات أحادية العدد الكروموسومي ومضاعفتها لإنتاج سلالات نقية تستعمل في برامج التربية المختلفة خاصة في المحاصيل خلطية التلقيح.
- تقصير الفترة الزمنية التي يستغرقها برنامج التربية حيث يمكن اختصار عدة سنوات من برامج التربية.

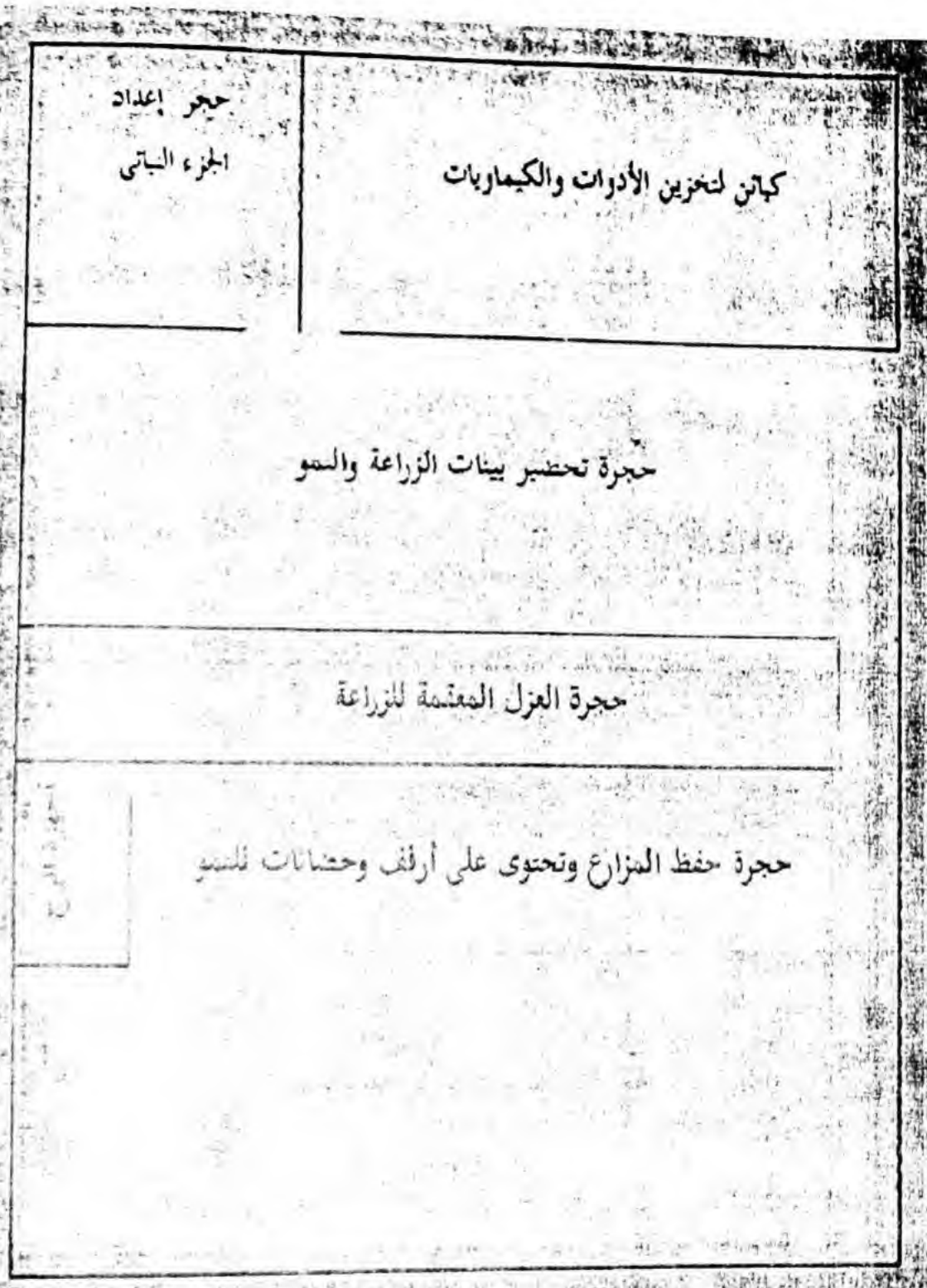
مختبر زراعة الأنسجة

تختلف مساحة وتجهيزات معمل زراعة الأنسجة طبقاً للغرض من إنشاء المعمل، فعلى سبيل المثال المشاتل التجارية يمكنها أن تخصص حجرة أو أكثر بهدف الإكثار الدقيق لبعض النباتات. بينما يكون المعمل أكثر ترتيباً وتجهيزاً وأكبر في المساحة في الشركات المتخصصة في الإنتاج التجاري. ويتضح من هذا عدم وجوب تصميم معين وتجهيزات خاصة لمعمل زراعة الأنسجة. لكن يجب توفير بعض الشروط الأساسية في المبنى والتجهيزات التي لا يمكن الاستغناء عنها. وأول ما يجب مراعاته عند إنشاء المعمل هو أن يكون في مكان بعيد عن مصادر التلوث الميكروبي والكيمائي كأدخنة وأبخرة المصانع ومناطق هبوب الرياح. ويراعى أن تكون الأبواب والشبابيك محكمة الغلق ولا تسمح بتسرب الأتربة أو دخول الحشرات والقوارص وما شابه ذلك. كما يجب أن تكون الأرضيات والحدران من مواد ملساء سهلة التنظيف.

أما عن المساحة والتقسيم الداخلى للمعمل فكما تقدم ليس هناك تصميم ملزم لكن يجب بقدر الإمكان توفير حجرة إعداد البينات، وأخرى منعزلة عنها وغير معرضة للتلوث وتسمى بغرفة الزراعة culture room وبها يتم فصل الجزء النباتى وزراعته فى البيئة المعدة لذلك. وتحتوى هذه الغرفة على وحدات العزل ذات الهواء المعقم المعروفة بالـ laminar air flow hood لعزل المُستأصل النباتى وزراعته. ونظرا لأن الجزء الأكبر والأهم من زراعة الأنسجة يتم فى هذه الغرفة فيجب أن يتم التحكم فى درجة حرارتها وتوفير مصدر للأشعة فوق البنفسجية لتعقيم جو الحجرة. ثم غرفه أخرى وتسمى بغرفة النمو growth room ويتم التحكم فى درجة حرارتها وساعات الإضاءة وكذلك شدة الإضاءة بغرض تحضين المزرعة. ويتحتم التسجيل الجيد للنتائج وجود آلة تصوير رقمية ذات جودة عالية، وللحصول على صور جيدة يتم استعمال ذلك الصندوق المضئ الذى يستعمله الأطباء لفحص صور أشعة أكس. ويوضع هذا الصندوق خلف أوعية الزراعة، وإن كانت المزرعة فى أطباق بترى ويراد تصوير النباتات فيتم وضع مصدر الإضاءة أسفلها. ويلحق بالمعمل صوبه لتنمية النباتات المستعملة وأقلمة النباتات الناتجة. ويراعى بقدر الإمكان عدم دخول الأفراد غير المعنيين بالعمل إلى المعمل للحد من التلوث. ويفضل وجود غرفة خارجية أمام المعمل يتم دخول المعمل. أما من حيث التجهيزات فإن هناك بعض الأجهزة الضرورية التى يجب توافرها بجانب التجهيزات المعملية العادية كأجهزة تقطير المياه وأجهزة قياس الوزن المختلفة، الثلاجات، المجمدات، جهاز التعقيم الرطب (الاورتوكلاف)، فرن للتعقيم، مقلب مغناطيسى، جهاز قياس الرقم الهيدروجينى ويلحق بالمعمل غرفة أخرى لغسيل الأدوات المستعملة. ويوضح الشكلين رقم (١-٤ و ١-٥) تصميمين مختلفين لمعامل زراعة الأنسجة.



شكل ٤-١: رسم تخطيطي لمعمل زراعة الأنسجة ولم تحدد الأبعاد على الرسم لكون ذلك يتوقف على المساحة المتاحة لكن تراعى نسبة الأجزاء لبعضها البعض.



شكل ١-٥: رسم تخطيطى لمعمل زراعة الأنسجة ولم تحدد الأبعاد على الرسم لكون ذلك يتوقف على المساحة المتاحة لكن تراعى نسبة الأجزاء لبعضها البعض.

الفصل الثاني

بيئات النمو المستعملة في زراعة الأنسجة

من المعروف في تغذية النبات أن هناك مجموعة من العناصر الغذائية اللازمة لنمو النباتات بصفة عامة يطلق عليها العناصر الأساسية أو الضرورية essential elements وقد تدخل تلك العناصر في تركيب النبات مثل النتروجين والكربون والأكسجين، وبعضها لا يدخل في تركيب الخلايا كالبوتاسيوم لكنه يؤثر على النمو. كما يعتبر بعضاً منها كالحديد والمنجنيز والمولبدنيوم عوامل مساعدة في العديد من التفاعلات الكيميائية. وتقسم العناصر الأساسية وهي أربعة عشر - بصرف النظر عن الكربون والهيدروجين والأكسجين- على حسب الكمية التي يحتاجها النبات إلى مجموعتين هما العناصر الكبرى macroelements وتشمل النتروجين، والفوسفور، والكالسيوم، والبوتاسيوم، والماغنسيوم، والكبريت والقسم الآخر يضم العناصر الصغرى microelements وهي الحديد، والمنجنيز، والزنك، والكلوريد، والصوديوم والبورن، والنحاس، والمولبدنيوم. وقد أضاف (Witte et al. 2002) النيكل إلى العناصر الصغرى في مزارع الأنسجة حيث شجع من نمو البطاطس وفول الصويا معملياً لدوره البارز في أيض النتروجين. ويعتقد أن عدم حدوث تسمم باليوربا على الرغم من عدم إضافة النيكل إلى البيئة فيرجع إلى إحتواء الأجار المستعمل في تصلب البيئة على شوائب من النيكل. وأمكن لعلماء تغذية النبات تحديد تلك العناصر باستخدام نظم الزراعة بدون تربة. والجدير بالذكر أن هناك تشابه كبير في الأسس المتبعة لتحديد مكونات بيئة مزارع الأنسجة من العناصر المعدنية وتحضير المحاليل المغذية للنباتات في البيوت المحمية. وبصفة عامة هناك عدة شروط يجب توافرها في العنصر حتى يصبح من العناصر المغذية وهي:

١. يؤدي غياب هذا العنصر من وسط النمو إلى عدم قدرة النبات على إتمام دورة حياته الطبيعية.

٢. يسبب نقص العنصر من وسط النمو أعراض مرضية لا تزول إلا بإضافة هذا العنصر ولا يمكن لعنصر آخر أن يحل محله.

٣. يدخل العنصر في تركيب أو تخليق جزئ أساسي للنمو.

٤. يدخل هذا العنصر مباشرة في عمليات الأيض النباتي.

وأصبح من الثابت في علم زراعة الأنسجة أهمية تلك العناصر الضرورية لنمو النباتات في الطبيعة وكذلك نمو النباتات والأعضاء في مزارع الأنسجة. وكان التأخر في التوصل إلى وسط غذائي مناسب لنمو مزارع الأنسجة حجر عثرة في سبيل تقدمها لفترة طويلة جداً (Vasil, 2008). وقد أشار (Ramage & Williams, 2002) إلى دور العناصر المعدنية في تنظيم عملية الكشف في مزارع الأنسجة. ويتوقف نجاح زراعة الأنسجة في تحقيق هدف محدد على مدى توفر تلك العناصر بصورة ميسرة للامتصاص في الوسط المغذي. وقد اعتمدت الأبحاث التي حددت التركيب الأمثل للبيئات المستعملة في مزارع الأنسجة على تحليل النباتات وتقدير نسب العناصر المختلفة في أنسجتها. ويرى (Gislerod et al., 2005) أنه ربما يساعد تحليل أنسجة نبات ما في تحديد التركيز الأمثل من العناصر المختلفة التي تحفز نموه في مزارع الأنسجة، والجدير بالذكر أن هذه كانت الاستراتيجية التي اتبعها Murashige and Skoog (1962) في تحضير البيئة المشهورة لهما وهو نفس التوجه الحديث الذي يشير إليه (Bouman & Tiekstra, 2005).

وبالإضافة إلى تلك العناصر الأساسية فإن زراعة الأنسجة تتطلب إضافة الكربوهيدرات في صورة سكر القصب غالباً كمصدر للطاقة الضرورية لعمليات النمو والتكشف، وذلك لأن الأنسجة المنزرعة وكذلك النباتات المستنسخة منها ليست لها القدرة غالباً على القيام بعملية البناء الضوئي لانخفاض الكثافة الضوئية، أو لأن

المزرعة قد تكون محفوظة في الظلام. ويمكن تحت ظروف محددة (Zobayed, 2005) خفض تركيز الكربوهيدرات أو الاستغناء عنها تماماً فيما يعرف بالمزارع خلية التغذية mixophotoautotrophic أو ذاتية التغذية autophototrophic وهناك بعض الأحماض العضوية والأمينية والفيتامينات والهرمونات التي تضاف للبيئة لأهميتها في النمو والتكشاف. وأهتم العديد من العلماء بعمل عدة توليفات مختلفة من العناصر الغذائية المكونة للبيئة لتلائم مع نوع النسيج المنزوع والغرض من زراعته. وقبل أن نتعرض لذلك بشيء من التفصيل يجب أن نعرض بعض المصطلحات والمفاهيم الكيميائية الهامة في هذا الصدد:

العنصر Element: هو المادة التي لا يمكن أن تقسم إلى مواد أخرى بالطرق الكيميائية العادية مثل الكربون والنحاس وغيرها.

الذرة Atom: هي أصغر جزء من المادة يحتفظ بخواص العنصر، وتوجد الذرة في الحالة الحرة في صورة جزيء في بعض الحالات يكون الجزيء بسيط مثل النيتروجين والفسفور والبوتاسيوم أو مكون من ذرتين مثل الهيدروجين والأكسجين ويوضح عدد الذرات برقم صغير أسفل الرمز الكيميائي مثل H_2 و O_2 .

المركب Compound: يتكون من اثنين أو أكثر من العناصر التي اتحدت كيميائياً بنسبة ثابتة مثل $C_{12}H_{22}O_{11}$ و H_2O و HCl .

الجزيء Molecule: أصغر جزء من المركب يمكن أن يوجد على إنفراد مع احتفاظه بخواص المركب.

الأيون Ion: ذرة أو مجموعة من الذرات لها شحنة كهربائية سالبة أو موجبة، على سبيل المثال يتأين مركب $NaCl$ عند إذابته في الماء لانخفاض التجاذب بين الأيونات إلى أيون صوديوم Na^+ له شحنة موجبة ويسمى كاتيون cation وأيون كلور Cl^- سالب الشحنة ويسمى أنيون anion. وينتج الأيون الموجب عندما يفقد الجزيء أو الذرة

المتعادلة إلكترون أو أكثر، أما الأيون السالب فينتج عندما يكتسب الجزيء أو الذرة المتعادلة إلكترون أو أكثر. وينتج عن الاتحاد بين أيون موجب وآخر سالب تكوين حامض أو قاعدة أو ملح. أما عدد الشحنات الكهربائية على الأيون فيعرف بالتكافؤ. وتتفاعل الأيونات مع بعضها البعض على أساس تكافؤها فمثلاً يشترك كاتيون أحادي التكافؤ كالصوديوم Na^+ مع أنيون واحد سالب من الكلور Cl^- ليعطى NaCl أما كاتيون الكالسيوم الثنائي Ca^{2+} فيتحد مع أنيونين من الكلور Cl^- ليعطى CaCl_2 .

الملح Salt: هو المركب الذى يتأين عند ذوبانه فى الماء ويعطى أيونات غير أيونات الهيدروجين H^+ أو الهيدروكسيل OH^- .

الوزن الجزيئى Molecular weight: وهو يشير إلى مجموع الأوزان الجزيئية لذرات العناصر التى يتركب منها المركب معبراً عنها بالجرام. على سبيل المثال تتركب نترات البوتاسيوم KNO_3 من ذرة بوتاسيوم وذرة نتروجين وثلاث ذرات أكسجين، وحيث أن الوزن الجزيئى لتلك الذرات هو $\text{K}=39.102$ و $\text{N}=14.0067$ و O فإن وزنها الجزيئى هو $15.9994 = 39.102 \times 1 + 14.0067 \times 1 + 16.00 \times 3$
 ١٥.٩٩٩٤

المولريته Molarity: يحضر محلول تركيزه مولر واحد من المادة بإذابة الوزن الجزيئى للمادة معبراً عنه بالجرام فى لتر من المذيب أى أن المولرته هى عدد المولات من المركب المذابة فى لتر من المذيب ويرمز لها بالرمز M . ومن الأفضل أن تستخدم وحدات molarity وليس الجرام/لتر فى تحضير بيانات مزارع الأنسجة حيث يحتوى المول من أى مادة على عدد ثابت من الجزيئات وهو 6.023×10^{23} وهو ما يعرف برقم Avogadro. ومن ثم يمكن مقارنة النشاط البيولوجى للمركبات على أساس عدد المولات. وإذا كان المركب موجوداً فى صورة ملح فإن عيارية الأيونات الداخلة فى تركيبه يمكن أن تحسب بضرب عياريته فى الجزيئات المختلفة. وعلى هذا فإن ٢٠:

مليمول من CuSO_4 تحتوى على ٢٠ مليمول من Cu^{2+} و ٢٠ مليمول من $(\text{SO}_4)^{2-}$.

أما ١٠ مليمول من $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4^{2-}$ فتحتوى على ١٠ مليمول من NH_4^+ و ١٠ مليمول من SO_4^{2-} . ويلاحظ أن نفس عدد أيونات النحاس Cu^{2+} يوجد فى ٢٠ مليمول من CuSO_4 أو $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ وعلى ذلك يكون تعبير ٢٠ مليمول من Cu SO_4 أفضل لأن العنصر قد يكون متوفراً فى صورة الملح المائى أو غير المائى. وبذلك يمكن حساب الكمية اللازمة من أى الملحين لتعطى كمية النحاس المطلوبة. لكن بأن يقال أن ١٩ ملجم/لتر من CuSO_4 أضيفت إلى البيئة فإن القارئ قد يسأل هل هى ٢٦ مليمول $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ أم ١٢.٨ مليمول Cu SO_4 . ولكن من عيوب استخدام وحدات العياريه فى تحضير البيئات ضرورة حساب عدد الجرامات التى يجب إضافتها للحصول على نفس التركيز. لكن كما سبق فهى أكثر دقة فى المقارنة بين التركيزات المختلفة من المركبات. ويمكن ضرب المثال التالى للتوضيح إذا أعطى ٣ ملجم/لتر من منظم النمو 2,4-D نفس الكالس المتكون عند استعمال ٢.٥ ملجم/لتر IAA فأيهما أكثر تأثيراً؟ علماً بأن الوزن الجزيئى لهذين المركبين هو ٢٢١.٠٤ و ١٧٥.١٩ على التوالى. نلاحظ أن عدد الجزيئات الموجودة من كلا المركبين هو $2,4-D = 221/3 = 13.6 \text{ mM}$ أما $\text{IAA} = 175.19/2.5 = 14.2 \text{ mM}$. أى أن 2,4-D أكثر تأثيراً حيث أن عدد أقل من الجزيئات أعطى تأثيراً مساوياً لعدد أعلى من جزيئات IAA. ولذا تشترط بعض المراجع العلمية عدم استخدام وحدات الوزن عند الإشارة إلى التركيزات المستعملة من المواد الكيميائية المختلفة.

ملحوظة:

$$1\text{g} = 1000 \text{ mg} \quad \text{mg} = 1000 \mu\text{g} \quad 10^{-6} = 1.0 \text{ mg/l} = 1 \text{ ppm}$$

$$10^{-9} = 0.001 \text{ mg/l} = 1\mu\text{g} \quad 10^{-7} = 0.1 \text{ mg/l}$$

$$\text{mM} = \text{MW in } 1 \mu\text{M} = \text{MW in } \mu\text{g/l} = 10^{-6} \text{ M} = 10^{-3} \text{ mM}$$

$$\text{mg/L} = 10^{-3} \text{ M}$$

وفيما يلي عرض مفصل لمكونات بيئات النمو المستعملة في زراعة الأنسجة.

أولاً: المكونات غير العضوية Non organic components

يمتص النبات الكامل وكذلك الأنسجة والخلايا في مزارع الأنسجة العناصر الغذائية في صورة أيونات، وعادة يتم إضافة العناصر المغذية في صورة أملاح حيث تتأين في البيئة. ويتم امتصاص بعض العناصر في مزارع الأنسجة في صورة كاتيونات مثل Ca^{2+} و K^{+} و Mg^{2+} وبعضها في صورة أنيونات مثل Cl^{-} و SO_4^{-} و H_2PO_4 أما النتروجين فيمتص في صورة كاتيون الأمونيا NH_4^{+} أو أنيون النترات NO_3^{-} . وتعتبر عملية اختيار التركيز الأنسب من الأيونات المختلفة وكذلك الاتزان الأيوني بين الأيونات وبعضها البعض، بالإضافة إلى التركيز الكلي للأيونات في البيئة من أهم العوامل المؤثرة في نجاح زراعة الأنسجة. هذا مع الأخذ بعين الاعتبار الرقم الهيدروجيني للبيئة فهو المحدد الأساسي لتيسير العناصر. ولما كانت الخلايا النباتية في مزارع الأنسجة على العكس من النباتات في المزارع المائية تتحمل تركيزات عالية نسبياً من Na^{+} و Cl^{-} دون ضرر فإن هذه الأيونات لا تعطى أهمية كبيرة عند تحضير البيئة ومن ثم تعتبر الأملاح المحتوية على الصوديوم والكلور مصدراً للعناصر الأخرى. لكن قد يؤدي خفض تركيز الكلور مع زيادة الفوسفور والمغنيسيوم إلى تحسين النمو واستمراره لفترة أطول دون الحاجة إلى تجديد البيئة المغذية (Gislerod et al., 2005)

يحصل النبات على العناصر الغذائية عن طريق الانتقال الحر والذي يعرف بالبسيط دون الحاجة إلى طاقة، أو بعملية الانتقال النشط التي تحتاج إلى طاقة. وقد أوضح (1993) Williams أن امتصاص العناصر من البيئة يتناسب مع تركيزها حتى

الضعف، لكن قد يختلف الأمر مع بعض العناصر فزيادة تركيز الزنك في البيئة لا يترتب عليها زيادة امتصاصه ، بمعنى أن للعنصر تركيز أمثل في النسيج لا يزيد عنه (Leifert *et al.*, 1995). والامتصاص النشط لا يرتبط في غالب الأمر بتركيز الأيون عكس الامتصاص غير النشط الذي يتأثر بتركيز الأيون ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني، بالإضافة إلى الحالة الفسيولوجية والبيوكيميائية للنسيج. ويجب الإشارة إلى أن ثغور النباتات في مزارع الأنسجة تكون مفتوحة مما يؤهلها لإمتصاص المكونات المختلفة للبيئة (De Klerk & Wijnhoven, 2005)، على الرغم من تشبع الفراغ المحيط بالنباتات في مزارع الأنسجة بالرطوبة. أى أن امتصاص الماء والعناصر من البيئة لا يخضع لنقص الرطوبة في الفراغ المحيط بالنبات كما هو الحال في الظروف الطبيعية حيث تتمتع النباتات في مزارع الأنسجة بقدرة عالية على تدفق الماء عبر انسجتها لأن الثغور تكون مفتوحة غالباً (Beruto *et al.*, 1999). وفيما يلي عرض موجز للعناصر المغذية الكبرى من حيث نوعها وأهميتها والصورة التي تضاف عليها والتركيز الشائع منها في بيئات مزارع الأنسجة وقد ناقش كلا من (Pierik, 1987) و (Leifert *et al.*, 1995) و (Bouman & Tiekstra, 2005) و (George & De Klerk, 2008) ذلك باستفاضة.

أ. العناصر المغذية الكبرى Microelements

١. النيتروجين

يدخل النيتروجين في تكوين العديد من المركبات العضوية كالبروتين، والأحماض النووية، والبروتوبلازم، والقلويدات. وتظهر أعراض نقصه على صورة اصفرار النبات وتقرم النمو. وتتراوح نسبة النيتروجين في النباتات المختلفة من ١.٥- ٤% من الوزن الجاف. ويتأثر النمو والتكثف في مزارع الأنسجة بدرجة كبيرة على مدى تيسر النيتروجين والصورة الموجودة منه. وتمتاز الأنسجة المنزرعة بقدرتها على امتصاص النيتروجين إما في صورة أمونيا NH_4^+ وهى صورة مختزلة أو نترات

NO_3^- وهى صورة عالية الأكسدة من النتروجين وتدخل أيونات NH_4^+ بعد امتصاصها مباشرة فى عمليات الأيض النباتى أما NO_3^- فلا بد أن تختزل بنزع الأكسجين وإحلاله بالهيدروجين فتتحول إلى NH_4^+ قبل دخولها فى عمليات الأيض النباتى، وهذه عملية مستهلكة للطاقة. ومن ثم فإن معظم النباتات تحتوى على تركيز أعلى من NH_4^+ بالمقارنة مع NO_3^- . وعلى الرغم من ضرورة اختزال NO_3^- قبل دخولها فى عمليات الأيض النباتى فإنه يجب إضافتها لبيئة مزارع الأنسجة بل تحتوى أغلب البيئات على تركيز عالى من النترات بالمقارنة مع الأمونيا، وذلك للمحافظة على الرقم الهيدروجينى للبيئة والذي يتم ضبطه عند إعداد البيئة ليكون ٥.٨-٥.٥ لتجنب التأثير السام لأيونات NH_4^+ فى البيئة.

تمتص الأمونيا من البيئة فى الوسط القلوى ويصاحب ذلك خروج أيونات الهيدروجين للبيئة فيخفض الرقم الهيدروجينى إلى ٤.٢-٤.٦ وعند ذلك يثبط امتصاص الأمونيا ويحفز امتصاص النترات والذي يصاحبه خروج أيونات الهيدروكسيل للبيئة مما يرفع الرقم الهيدروجينى للبيئة ويشجع امتصاص الأمونيا مرة أخرى. وبذلك يحدث اتزان فى الرقم الهيدروجينى للبيئة بدون وجود محلول منظم للرقم الهيدروجينى. ولثبات الرقم الهيدروجينى أهمية كبرى ليس فقط لدوره فى امتصاص العناصر المختلفة بل للعوامل الأخرى التى سوف توضح لاحقاً. وقد وجد أن استهلاك مليمول واحد من الأمونيا فى تكوين مادة عضويه يصاحبه خروج حوالى ١.٠-٠.٨ بروتون من الهيدروجين إلى البيئة، ولكل استهلاك مكافئ من النترات يخرج ١-١.٢ من بروتون الهيدروكسيل إلى البيئة. وبذلك إذا كانت نسبة النترات فى البيئة ضعف الأمونيا لا يحدث تغير فى الرقم الهيدروجينى للبيئة، لكن لا بد أن يؤخذ فى الاعتبار ارتباط الامتصاص بالنوع النباتى. وهناك بعض الأبحاث التى أشارت إلى إمكانية استعمال المحلول المنظم المكون من $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$. ومن الضروري عند إعداد البيئة

أن تحدد نسبة $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ لتأثير ذلك على بعض الظواهر التالية بالإضافة إلى الرقم الهيدروجيني:

- حفظ اتزان شحنة النسيج والتخلص من H^+ و OH^- الناتجة من عملية الأيض.
- في بعض الحالات ولسبب غير معروف لا ينمو النسيج إذا احتوت البيئة على NO_3^- كمصدر وحيد للنيتروجين.
- لوحظت ظاهرة التميؤ الزجاجي والمعروفة بـ *hyperhydricity* أو *vitrification* أو *glassiness* في الأفرع النامية في بيئة بها الأمونيا مصدر وحيد للنيتروجين. حيث يسبب ارتفاع تركيز الأمونيا زيادة في معدل التخليق الحيوي للبروتين والأحماض الأمينية وزيادة في معدل استهلاك الكربوهيدرات. وتصبح الأفرع (كما في الشكل رقم ٢-١) مكتنزة بالماء ورخوة ولها مظهر زجاجي وسهلة الكسر. وغالباً تفقد تلك الأفرع القدرة على النمو الطبيعي والتضاعف والأقلمة، وبذلك لا يمكن استعمالها في الإكثار مرة أخرى. وقد اختفت هذه الظاهرة في مزارع أنسجة بعض النباتات عندما أضيفت النترات للبيئة. وعلى العموم تتضح أعراض نقص النيتروجين على النسيج باستعمال الأمونيا أو النترات كمصدر وحيد للنيتروجين دون وجود محلول منظم للرقم الهيدروجيني من بعض الأحماض العضوية ثلاثية الكربوكسيل كالكسكسك.
- كما سبق القول يعتبر وجود أيونات الأمونيا والنترات أحد العوامل الأساسية التي تحافظ على ثبات الرقم الهيدروجيني للبيئة حيث يعمل كلا منهما على توفير الظروف المناسبة لامتصاص الآخر. وقد وجد (Avila et al. 1998) أن الرقم الهيدروجيني لبيئة (MS); Murashige & Skoog (1962) ينخفض بمعدل ٠.٧ وحدة بعد ١٥ يوم من زراعة أفرع البطاطس إذا كانت البيئة تحتوي على الأمونيا كمصدر وحيد للنيتروجين.
- لاحظ (Arnozis et al. 1988) إحتواء النباتات النامية في بيئة بها الأمونيا كمصدر وحيد للنيتروجين على نسبة مرتفعة وغير عادية من إنزيم phosphoenolpyruvate (PEP) الضروري في عملية تثبيت ثاني أكسيد الكربون أثناء البناء الضوئي. لكن على الرغم من ذلك تثبط معدل تخليق الكلوروفيل والبناء الضوئي تحت هذه الظروف.



شكل ١-٢: في اليسار الأفرع العائدية لنباتات القرنفل *Dianthus caryophyllus* النامية في مزارع الأنسجة وأفرع بها ظاهرة التميز الزجاجي في اليمين .

وسجلت الكثير من الدراسات أهمية النتروجين الكلى بالبيئة علاوة على صورته في عمليات نمو الخلايا وتكثفها وتحويل النتروجين إلى الصورة العضوية. فوفرة النتروجين في صورة ميسرة ضرورية للحصول على نمو معلق الخلايا في صورة غير متكثفة، بينما يؤدي انخفاض تركيز النتروجين إلى زيادة معدل أيض بعض المركبات الخالية منه مثل اللجنين المصاحب لعملية التكثف. وبصورة عامة يمكن القول أن الأنسجة يمكنها النمو في بيئة تحتوي على الأمونيا فقط بإضافة محلول منظم للرقم الهيدروجيني لوسط النمو، حيث أن وفرة الأمونيا تزيد من معدل تكوين البروتين والأحماض الأمينية مع استهلاك أقل للطاقة من المواد الكربوهيدراتية. ويبدو أن هذا التغير في الأيض الطبيعي يسبب ظاهرة التميز الزجاجي. لكن يبدو أن الأمونيا لها دوراً في تنظيم عملية انقسام الخلايا وتكون الجدر الخلوية بالإضافة إلى تأثيرها على نشاط منظمات النمو في المزرعة. ولوحظ تكثف أشطاء من كالوس نباتات Brassica عندما كان التركيز الكلى للنتروجين ٣٥-٤٥ ملليمول وقل عدد

الأشطاء بارتفاع أو انخفاض التركيز عن ذلك. كما سجل Gertsson (1988) زيادة في عدد الأشطاء المتكشفة من زراعة عنق أوراق نباتات *Senecio hybridus* بزيادة تركيز النتروجين في بيئة MS إلى ٧٥ مليمول بينما انخفض العدد عند تركيز ٣٠ مليمول مع ثبات نسبة الأمونيا إلى النترات.

نسبة $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ في البيئة

يعتبر أيون النترات مصدر هام للنتروجين في بيئات مزارع الأنسجة، وتحتوى أغلب البيئات على نسبة كبيرة من النتروجين في هذه الصورة والتي تعتبر غير سامة على العكس من الأمونيا التي تزيد من تخليق هرمون الإثيلين في أنسجة النبات فقد سجل Ogura-Tsujita and Okubo (2006) انخفاضاً يقدر بـ ٣٠-٥٥% في معدل تخليق الإثيلين للمستأصلات النباتية لنبات *Cymbidium kanran* بعد ٣-١ شهور من الزراعة عند استعمال بيئة MS فقيرة في النتروجين. وعند محاولة حساب التركيز الأمثل من الأمونيا والنترات في البيئة المستخدمة لزراعة أنسجة نبات ما لابد أن يؤخذ في الاعتبار التركيز الكلى للنتروجين بالإضافة إلى نسبة $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ، فمثلاً بيئة MS تحتوى على نسبة عالية من أيون النترات مقارنة مع الأمونيا (٣٤:٦٦). كذلك يلاحظ أن التركيز الكلى للنتروجين بهذه البيئة أعلى من معظم البيئات الأخرى. وفي معظم البيئات المستعملة لزراعة البقوليات ينصح بزيادة هذه النسبة أى تركيز النترات إلى الأمونيا. وفي بعض المزارع يتم تعديل التركيز الكلى للنتروجين في البيئة المستعملة بغرض تحسين النمو. وقد أوضح George & De-klerk (2008) أن لهذه النسبة أهمية في آلية فعل منظمات النمو لكن تظل هذه الآلية غير معروفة بصورة تامة. فعلى سبيل المثال تحتاج الخلايا إلى تركيز منخفض من السيوكينين للإنقسام عندما يكون تركيز النتروجين المختزل مرتفع نسبياً. ويحتاج بروتوبلاست خلايا الدخان إلى تركيز ٢-٠.٥ ملجم/لتر من BA إذا كانت البيئة تحتوى النترات فقط. وعند إضافة

الأمونيا أو حامض الجلوتامين للبيئة فإن التركيز الضروري من منظم النمو ينخفض، ويمكن للخلايا الانقسام بصور أسرع وبدون الحاجة إلى منظم النمو عند إضافة اليوريا والأمونيا أو الجلوتامين. كما تلعب صورة النتروجين دوراً في استجابة الخلايا للاكسينات وقد يرجع ذلك إلى تأثيرها على الرقم الهيدروجيني لجدر الخلايا. ويتضح من جدول رقم (١-٢) تأثير نسبة $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ وكذلك النتروجين الكلى على زراعة أنسجة نباتات *Eucalyptus globulus* كما أشار (Bennett et al., 2003) حيث يتضح أن استعمال ربع تركيز الأمونيا وبدون إضافة النترات وخفض تركيز الحديد إلى الربع في بيئة MS يعطى أفضل نسبة تجذير وعدد جذور بينما انخفضت النسبة المئوية لتكوين الجذور إلى النصف تقريباً برفع تركيز الأمونيا إلى نصف تركيزها.

وفي تجربة لدراسة تأثير صورة النتروجين المعدنى فى البيئة المستعملة لإكثار صنفين من نباتات *Chrysanthemum* تم تغيير تركيز النتروجين الكلى لبيئة MS والتي تحتوى على ٦٠ مليمول نتروجين واستعملت تركيزات تتراوح بين ٦-٢٤٠ مليمول مع المحافظة على ثبات نسبة الأمونيا والنترات كما هى فى البيئة الأصلية. وأشارت النتائج إلى أن أعلى معدل لتكوين الأشتاء من الحامل الزهرى المستخدم كجزء نباتى كان باستعمال تركيز ٣٠-١٢٠ مليمول، وكان أقل معدل لتكوين الأشتاء عند استعمال تركيز ٦ أو ٢٤٠ مليمول اعتماداً على الصنف المنزوع. ولوحظ انخفاض حاد فى عدد الأشتاء المتكونة عند زيادة تركيز النتروجين عن ١٢٠ مليمول (Roest & Bokelmann (1975 ودراسة تأثير التركيز الكلى للنتروجين على الإكثار الدقيق وإنتاج المواد الفعالة لنباتات *Ruta graveolens* قام (Mohamed and Ibrahim, 2011) بخفض تركيز النتروجين من ٩٠ مليمول فى وسط MS إلى ٦٠ مليمول أو رفعه إلى ١٢٠ مليمول. مع المحافظة على نسبة الأمونيا للنترات ثابتة. وقد زاد الوزن الطازج للأشتاء برفع تركيز النتروجين حيث سجل ٥٨، ٦٨، و٦٩ جم/دورق باستعمال تركيز ٦٠، ٩٠، و١٢٠ مليمول من النتروجين على التوالى.

وعلى الرغم من عدم تأثر الوزن الجاف معنوياً باختلاف تركيز النتروجين فإن تركيز الروتين والفيروكيومانين في المادة الجافة وكذلك الكمية الكلية قد زادت برفع تركيز النتروجين من ٦٠ إلى ٩٠ ملليمول لكن قل المحصول النهائى عند تركيز ١٢٠ ملليمول. جدول ١-٢: تأثير $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ و FeNaEDTA في بيئة MS على إنتاج الجذور في مزارع أنسجة نباتات *E. globulus* كما أشار Bennett et al. (2003).

عدد الجذور/النبات	% للتجذير	التركيز في MS		
		FE	NO_3^-	NH_4^+
٥.٩	٩٤	١/٤	٠	١/٤
٤.٢	٦٢	١/٤	١/٤	١/٤
٣.٠	٦٢	١/٤	١/٢	١/٤
٤.٠	٩٠	١/٤	٠	١/٢
٤.١	٦٤	١/٤	١/٤	١/٢
٣.١	٤٩	١/٤	١/٢	١/٤
٣.٤	٩٠	١/٢	١/٤	١/٢

وتوضح النتائج التي أشار إليها Bennett et al. (2003) أن تكوين الجذور على النباتات الناتجة من زراعة أنسجة نباتات *E. globulus* والمبينة في جدول رقم (٢-٢) أن هناك تأثيراً واضحاً لنسبة الأمونيا إلى النترات على تكوين الجذور. وكذلك كان لاختلاف مصدر النتروجين تأثيراً في عدد الجذور المتكونة للنبات الواحد. وبين Woodward et al. (2006) أن لمحتوى النسيج من النتروجين والذي يتأثر بالظروف البيئية دوراً في استجابة المستأصل النباتي في الزراعة المعملية وقد لاحظ أن أعلى معدل لتكوين الجذور على أفرع *E. marginata* تحقق عند إحتواء بيئة MS على تركيز ٧.٥ ملليمول من النتروجين ونسبة ٢:١ من النترات والأمونيا على التوالي،

بالإضافة إلى ١٠ مليمول من (N-morpholino)ethanesulphonic acid (MES) 2- لتنظيم الرقم الهيدروجيني. وأمكن ثبات الرقم الهيدروجيني عند اضافة النتروجين في صورة نترات الفضة لكن باستعمال ١٠ مليمول من MES. ومن هذا يتضح ضرورة دراسة متطلبات كل نبات على حدى لمعرفة التركيز الأمثل من الأمونيا والنترات لنجاح تكوين الكالس وعمليات الكشف المختلفة.

ولدراسة تأثير تركيز الأمونيا والنترات على تكوين الأجنة الجسدية بزراعة السويقة الجنينية العليا لنباتات *Pelargonium zonal* رباعية التضاعف، تم تعديل تركيز نترات الأمونيوم في البيئة المستعملة من ٠.٩٤ إلى ١١.٤ مليمول. وكان لزيادة التركيز تأثير معنوى فى عدد ونوعية الأجنة المتكونة. حيث زاد عدد الأجنة ذات الطور الكروى globular ليتراوح بين ٢ إلى ٣ جنين/مُستأصل نباتى، وهى تمثل زيادة مقدارها ٢٧% عن البيئة الخالية من نترات الأمونيوم. وبينما أدى التركيز العالى ٦.٦- ١١.٤ مليمول لزيادة عدد الأجنة فى الطور السابق انخفض كما عدد الأجنة التى تطورت إلى الطور القلبي التوربيدى heart-torpedo وفشلت الأجنة المتكونة فى تكوين الأوراق الفلقية. وكان أحسن معدل لتكوين الأوراق الفلقية هو استعمال تركيز ٢.٤ مليمول من نترات الأمونيوم (Wilson et al., 1996).

٢. الفوسفور

يزيد تركيز الفوسفور فى القمم الميرستيمية للنبات ويتشابه دوره مع النتروجين من حيث مدى أهميته للنبات بالرغم من إحتواء الأنسجة على كمية قليلة منه مقارنة بالنتروجين. ويدخل الفوسفور فى عمليات البناء الضوئى وتكوين وانقسام الخلايا وكذلك تطور الجذور، كما أن للفوسفور دوراً أساسياً فى تخليق المركبات الناقلة للطاقة. ويتم امتصاص الفوسفور امتصاصاً نشطاً من وسط النمو وتستعمل فى الصورة الثلاثية المؤكسدة PO_4^{3-} . ويضاف الفوسفور إلى بيئة مزارع الأنسجة فى صورة

جدول ٢-٢: تأثير استعمال مصادر مختلفة للنيتروجين على التجذير نباتات *E. globulus* كما بينها (Bennett et al. (2003

تركيز ومصدر النيتروجين (مليمول)	عدد الجذور/النبات
5 KNO ₃	٢.٢
10 KNO ₃	٢.٥
5 KNO ₃ + 2.5 Ca(NO ₃) ₂	٢.٤
5 KNO ₃ + 5 NH ₄ NO ₃	١.٥
5 KNO ₃ + 2.5 (NH ₄) ₂ SO ₄	٠.٩
5 KNO ₃ + 1.2 (NH ₄) ₂ SO ₄	١.٢
5KNO ₃ + 0.6 (NH ₄) ₂ SO ₄	٢.٢

فوسفات الصوديوم أو البوتاسيوم أحادية أو ثنائية الهيدروجين. ويتم تحول الفوسفور بين الصورة الأحادية والثنائية التكافؤ لهذه الأملاح في البيئة اعتماداً على الرقم الهيدروجيني. فعندما يكون الرقم الهيدروجيني أقل من ٧ تكون الصورة الأحادية $H_2PO_4^-$ هي السائدة والممتصة، وبزيادة قلوية الوسط تتحول هذه الصورة إلى الصورة الثنائية HPO_4^{2-} الأقل امتصاصاً. لكن يعتقد أن الصورة الثنائية لها قابلية للارتباط بمواقع الامتصاص على سطح الخلايا بدرجة أعلى من الأحادية مما يزيد من امتصاصها. أما الصورة الثلاثية PO_4^{3-} الموجودة في الوسط القلوي فهي غير ممتصة، لكنها قد تصبح ميسرة للامتصاص عن طريق إنزيمات الفوسفاتيز التي تفرز من الأنسجة (George, 1993).

تحتوى معظم البيئات على تركيز ١.٣-١.٧ مليمول من الفوسفور والذي يضاف غالباً في صورة فوسفات البوتاسيوم وفوسفات الصوديوم المائية (KH_2PO_4 و $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$). وقد لاحظ (Leifert et al., 1995) أنه بالرغم من عدم كفاية محتوى بيئة MS من الفوسفور لنمو مزارع أنسجة نباتات *Hemerocallis* و *Iris* و *Delphinium* كان للمزرعة القدرة على النمو لبعض الوقت بعد استنفاد الفوسفور من

الوسط. ومن ثم ينصح برفع تركيز الفسفور في هذه البيئة إلى ٣.٧١ مليمول لزيادة معدل تكوين الأشطاء. وقد يسبب الاستهلاك المبكر للفوسفات من البيئة في المراحل الأولى من النمو تغيير رقمها الهيدروجيني. لكن يجب ملاحظة أن زيادة الصورة الميسرة من الفوسفات ربما تؤدي إلى تثبيط النمو في مزارع الأنسجة نظراً لترسيب الكالسيوم وبعض العناصر الأخرى.

وقد أدى نزع الفوسفات كلياً من بيئة MS زيادة تركيز الأحماض الأمينية الحرة في معلق خلايا الدخان وترقّف تخليق البروتين وزاد معدل تكسيره. ومن البديهي أن يتوقف معدل امتصاص الفوسفور على النوع النباتي ومعدل النمو، ففي معلق خلايا نباتات *Catharanthus roseus* المنزرع في بيئة MS المعدلة لتحتوي على تركيزات متباينة من الفوسفور زادت مدة النمو بزيادة تركيز الفوسفات إلى ٢.٦٤ مليمول. كما وجد أن تركيز ٢.٥١ مليمول من الفوسفات غير كافٍ لبعض النباتات وتزيد سرعة النمو والتكشف بزيادة الفوسفات إلى أن يصل إلى الحد الأمثل لكل نبات. ويعتبر تركيز الفوسفور في بيئة MS غير كافياً لبعض النباتات إذا كان معدل النمو عالياً مع استعمال كمية قليلة من البيئة، حيث ينخفض تركيز الفوسفات بسرعة. وقد سجل Leifert et al. (1995) انخفاض في تركيز الفوسفات إلى حد لا يكفي نمو المزارع التي سبق الإشارة إليها بعد عدة أسابيع من الزراعة وبالرغم من ذلك يمكن أن يستمر النمو لبعض الوقت حيث يمتاز الفوسفات بأنه عنصر متحرك ينتقل من الأنسجة المسنة إلى الحديثة. ولتحسين معدل الكشف عدة أصناف من العنب قام Mhatrea et al. (2000) برفع تركيز الفوسفات في وسط MS إلى ٢١٨ ملجم/لتر من فوسفات الصوديوم الأحادية. كما كان لمضاعفة تركيز أملاح MS تأثير مشجع على إكثار نباتات *Prunus avium* وتوقف ذلك على تركيز ومعدل امتصاص كلا من النتروجين والفوسفور (Ružić et al., 2000). وقد أمكن التغلب على ظاهرة التميؤ الزجاجي مع زيادة عالية جداً في معدل تكوين الأشطاء تصل إلى ثلاث أضعاف (٣٤ فرع/مُستأصل) برفع تركيز

الفوسفات فى بيئة MS إلى ٥.٣٧ (شكل رقم ٢-٢). وإذا كان لزيادة تركيز الفوسفات تأثيراً إيجابياً للنمو فى مزارع أنسجة النبات المستهدف فينصح بدراسة التأثير المشجع الميوانسيتول (Mohamed, 2011). وقد تبين فى هذه الدراسة الزيادة المعنوية العالية فى الوزن الطازج والجاف وكذلك النسبة بين الوزن الطازج والجاف للأشطاء التى نمت فى الوسط ذو التركيز العالى من الفوسفات.

٣. البوتاسيوم

وهو من العناصر الأساسية ذات التركيز المرتفع فى الأنسجة النباتية، وقد تفوق الكمية الممتصة منه باقى العناصر الأساسية عدا النتروجين على الرغم من عدم اشتراكه فى تخليق المركبات العضوية داخل النبات. وللبوتاسيوم دور مهم من حيث انقسام الخلايا وتكوين الكربوهيدرات والبروتين وبعض الإنزيمات والكلوروفيل، وكذلك فى معادلة الشحنات السالبة للأيونات العضوية وغير العضوية. ويمر البوتاسيوم بعد امتصاصه بسرعة عبر الغشاء الخلوى ليلعب دوراً أساسياً فى تنظيم الرقم الهيدروجينى والضغط الاسموزى للخلايا لأن أيونات البوتاسيوم، والكالسيوم والكلور تحتفظ بشحنتها داخل النبات على العكس من NH_4^+ , SO_4^{2-} , H_2PO_4^- التى تشارك فى تكوين المركبات العضوية بسرعة. ويؤدى نقص البوتاسيوم إلى نقص ضغط الامتلاء للخلايا وبذلك تصبح الأنسجة رخوة وحساسة للإجهاد المائى والملوحة. يتحرك أيون البوتاسيوم فى النبات مصاحباً لأيون النترات فى الخشب وعند اختزال النترات إلى أمونيا تتكون أحماض عضوية $\text{R}-\text{CO}_3$ ويصاحبها أيون البوتاسيوم فى اللحاء حتى الجذر حيث يتم نزع مجموعة الكربوكسيل ومعادلتها بالهيدروكسيل. ثم يرتبط أيون البوتاسيوم بأيون نترات جديد ويتحرر أيون الهيدروكسيل لمعادلة أيون النترات الممتص وبذلك يحافظ على الرقم الهيدروجينى للوسط. ويلعب البوتاسيوم نفس الدور فى مزارع الأنسجة لكن تظل ميكانيكية النقل غير واضحة بصورة تامة. ويؤدى نقص البوتاسيوم فى البيئة إلى ظاهرة التميؤ الزجاجى ونقص امتصاص الفوسفات. ويلاحظ

من جدول رقم (٢-٣) أن البوتاسيوم هو الأيون السائد في معظم النباتات بعد أيون النتروجين (Dixon & Gonzades, 1994).



شكل ٢-٢: ظاهرة التميؤ الزجاجي في مزارع أشطاء القرنفل *Dianthus caryophyllus* في الوسط وفي اليمين يلاحظ اختلاط النمو بين الطبيعي والتميؤ في بيئة MS، أما في اليسار فيلاحظ النمو الطبيعي مع زيادة في الكشف برفع تركيز الفوسفات في بيئة MS إلى ٦.٤٥ ملليمول.

لكن أشار (Loreti et al., 1988) إلى عدم تأثير رفع تركيز البوتاسيوم في بيئة MS على نمو مزارع *Prunus persica*. وغالباً يضاف البوتاسيوم للبيئة في صورة نترات البوتاسيوم وفوسفات البوتاسيوم KNO_3 و KH_2PO_4 وأحياناً كلوريد البوتاسيوم.

٤. الماغنسيوم

يدخل الماغنسيوم في تكوين جزئ الكلوروفيل بنسبة ١٥-٢٠%، وكذلك يساهم في تنشيط عدد من الإنزيمات خاصة تلك المنوط بها انتقال الفوسفات وحركة السكريات داخل النبات وتمثيل الأحماض النووية. وبجانب هذا الدور المغذي يلعب الماغنسيوم دوراً في الاتزان الأيوني في النبات. وتحتوي بيئات مزارع الأنسجة على تركيز منخفض نسبياً من الماغنسيوم يتراوح بين ٠.٧٥١-١.٦٢٣ ملليمول، ويضاف

غالباً في صورة كبريتات الماغنسيوم المائية $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. وبإنخفاض تركيز الماغنسيوم في البيئة المستخدمة لإنتاج الأجنة الجسدية في كالوس نباتات *Medicago sativa* قل عدد الأجنة المتكشفة. وسجل (Kintzios et al. (2004 ارتفاع في محتوى مزارع الأجنة الجسدية لنباتات البطيخ من الماغنسيوم بالمقارنة مع مزارع الكالس، مما يشير إلى دوره في تكشف الأجنة الجسدية. ولاحظ (Ohki & Sawaki (1999 أن الأشطاء المتكشفة من زراعة مستأصلات من الحامل النورى لنبات *Delphinium cardinale* في بيئة MS ضعيفة النمو شاحبة اللون بسبب انخفاض تركيز الماغنسيوم أو الحديد. ومن ثم تم رفع تركيز كلاهما مع ثبات تركيز الأمونيا والنترات أو خفض تركيز الأمونيا ورفع تركيز النترات للمحافظة على نفس التركيز الكلى للنتروجين المعدنى وهو ٦٠ مليمول. وتوضح النتائج المبينة في جدول رقم (٢-٤) تأثير الماغنسيوم، والحديد على عدد الأشطاء المتكونة ووزنها وكمية الكلوروفيل في أوراق النباتات المتكشفة.

٥. الكبريت

ينتشر الكبريت بانتظام بين أعضاء وأنسجة النباتات المختلفة فهو أحد مكونات بعض الأحماض الأمينية مثل السستين والسستئين والتي تدخل في تكوين البروتين وبعض الفيتامينات كالثيامين. والجزء الأكبر من الكبريت يوجد في الكلوروبلاست.

٦. الكالسيوم

يعتبر أيون الكالسيوم Ca^{2+} أحد الكاتيونات السائدة في النبات خصوصاً بالعصير الخلوى. ويتم تثبيت معظم الكالسيوم الممتص في جدر الخلايا في صورة بكتات الكالسيوم التي تكون الصفيحة الوسطى الضرورية في انقسام الخلايا. كما يساعد الكالسيوم أيضاً في حركة الكربوهيدرات والأحماض الأمينية خلال النبات. وللكالسيوم دوراً في التخلص من بعض نواتج الأيض حيث يتحد مع بعض المركبات السامة

كحامض الاكسالك ليكون اكسالات الكالسيوم. ويعتمد تكوين إنزيم β -glucan (1.3) الهام في أيض السيليلوز على وجود الكالسيوم، لذا فإن تكوين السيليلوز في خلايا مزارع الأنسجة لا يتم إلا في وجود الكالسيوم في البيئة. كذلك فإن نشاط بعض الإنزيمات والتفاعلات الفسيولوجية التي تحدثها الأوكسينات والسيبتوكينينات لا يتم في غياب الكالسيوم من الوسط. وعلى الرغم من أن الكالسيوم يوجد في السيبتوبلازم بتركيز واحد مليمول فإن النبات يقوم بضخه الكالسيوم إلى الفجوات العصارية ليحافظ على تركيز ٠.١ ميكرومول لتفادي ترسيب الفوسفات في السيبتوبلازم وكذلك إعاقة عمل أيون الماغنسيوم.

للكالسيوم دور هام في تكشف الأعضاء في مزارع الأنسجة من خلال تأثيره على الفعل الحيوي لمنظمات النمو. حيث يزيد السيبتوكينين من ارتباط الكالسيوم بالجدر الخلوية في المناطق التي تتكشف منها البراعم العرضية لاحقاً. وقد لاحظ Capitani and Altamura (2004) أن إضافة الكالسيوم تشجع تكوين المناطق الميرستيمية التي تعتبر الطور الأول لتكوين الأشطاء عند زراعة نخاع الدخان. ولأن الكالسيوم غير متحرك داخل الأنسجة النباتية، فإن الأفرع حديثة الكشف تحتاج إلى تركيز ثابت منه في العصارة المتدفقة. وتتضح أعراض نقص الكالسيوم في المزرعة بعد عدد مرات تكرار الاستزراع على هيئة إصفرار ويتبع ذلك موت القمم النامية وتكوين مزيد من الأفرع الجانبية وغالباً يصاحب ذلك ظاهرة التميؤ الزجاجي. وكان لزيادة تركيز الكالسيوم في بيئة MS بإضافة ٢.٥ مليمول باستعمال كلوريد الكالسيوم مع إضافة ٢٠٠ مليمول من البورن دوراً فعالاً في التغلب على مشكلة موت القمم النامية لنباتات *Haloxylon persicum* كما أشار (Mohamed et al., 2013).

وحيث أن أعراض نقص الكالسيوم قد تعزى إلى بطء إمتصاصه أو إنتقاله بسبب ارتفاع الرطوبة النسبية في الفراغ الغازي للمزرعة (Roche & Cassells,

(1996) فإن العمل على خفض الرطوبة النسبية في جو المزرعة وبالتالي زيادة معدل النتح باستعمال ظروف بيئة خاصة يقلل من أعراض نقص الكالسيوم في نباتات *Helianthus tuberosus*. لكن أشار (Mohamed et al., 2013) إلى عدم فاعلية زيادة معدل تهوية أوعية الزراعة بهدف خفض المحتوى الرطوبي في التخلص من مشكلة موت القمم النامية. وقد يستعمل تركيز أعلى من الكالسيوم لنفس الغرض، لكن يتوقف التركيز الأمثل على التركيب الوراثي للنبات ففي بعض الحالات لم يكن لإضافة المزيد من الكالسيوم تأثيراً في النمو أضف إلى ذلك أن المزيد من الكالسيوم في صورة كلوريد قد يسبب ظهور أعراض التسمم بالكلوريد. ويضاف الكالسيوم إلى بيئات زراعة الأنسجة في صورة كلوريد الكالسيوم المائي $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ أو نترات الكالسيوم المائية $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

ب. العناصر المغذية الصغرى Microelements

وهي لا تقل في أهميتها عن العناصر الكبرى لكن تحتاجها النباتات بتركيزات منخفضة مقارنة مع تلك الكبرى. وقد اتضح مدى أهمية العناصر المغذية الصغرى للنبات خلال النصف الأخير من القرن الماضي. وتضم هذه المجموعة الحديد، النحاس، المنجنيز، الزنك، الكوبلت، النيكل، اليود، المولبدنيم. وترجع فاعلية تلك العناصر لقدرتها على تغيير تكافؤها داخل النبات مما يزيد من نشاط الإنزيمات الضرورية للكثير من العمليات الحيوية. وللعناصر الصغرى أهمية في نشاط بعض الهرمونات وعمل الجهاز الوراثي للخلية. وفي بداية تطوير علم زراعة الأنسجة لم تضاف تلك العناصر للبيئة، وعلى الرغم من ذلك لم تظهر أعراض نقصها على الأنسجة. ويرجع ذلك لعدم نقاوة الكيماويات المستخدمة آنذاك والتي كانت تعتبر مصدراً لتلك العناصر.

جدول ٣-٢: تركيز أيونات العناصر الكبرى في البينات شائعة الاستعمال (Dixon & Gonzales, 1994).

الأيون	البيئات / التركيز بالمليمول	Knop ¹	Knudson ²	Heller ³	Nitsch ⁴	B ⁵	SH ⁶	MS ⁷	
N-total		١٠.٩٤٢	١٦.٠٣٦	٧.٠٥٨	٢٧.٣٨٥	٢٦.٧٥٦	٢٧.٣٣٦	٦٠.٠١٧	
NH ₄ ⁺		-	٧.٥٦٧	-	٨.٩٩٤	٢.٠٢٨	٢.٦٠٨	٢٠.٦١٢	
NO ₃ ⁻		١٠.٩٤٢	٨.٤٦٩	٧.٠٥٨	١٨.٣٩١	٢٤.٧٢٨	٢٤.٧٢٨	٣٩.٤٠٥	
H ₂ PO ₄ ⁻		١.٨٣٧	١.٨٣٧	٠.٩٠٦	٠.٥٠٠	١.٠٨٧	٢.٦٠٨	١.٢٤٩	
K ⁺		٤.٣١٠	١.٨٣٧	١٠.٠٦٠	٩.٨٩٧	٢٥.٨١٥	٢٤.٧٢٨	٢٠.٠٤٢	
Ca ²⁺		٤.٣٢٤	٤.٢٣٤	٠.٥١٠	١.٤٩٦	١.١٦٣	١.٣٦٠	٢.٩٩٣	
Mg ²⁺		١.٠١٤	١.٠١٤	١.٠١٤	٠.٧٥١	١.٠١٤	١.٦٢٣	١.٥٠١	
SO ₄ ²⁻		١.٠١٤	٤.٧٩٨	١.٠١٤	٠.٧٥١	٢.٠٢٨	١.٦٢٣	١.٥٠١	
Na ⁺		-	-	٧.٩٦٤	-	-	-	-	
Cl ⁻		-	-	١١.٠٨٠	٢.٩٩١	٢.٣٢٥	٢.٧٢١	٥.٩٨٦	
Total		٢٣.٣٥١	٢٩.٧٥٦	٣٩.٦٠٦	٤٣.٧٧١	٦٠.١٨٨	٦١.٩٩٩	٩٣.٢٨٩	

¹ White (1884), ² Knudson (1946), ³ Heller (1953), ⁴ Nitsch (1972), ⁵ Gamborg *et al.* (1986),
⁶ Schenk and Hildebrandt (1972) and ⁷ Murashige and Skoog (1962).

جدول ٢-٤: تأثير تغيير تركيز الأمونيا والماغنسيوم والحديد في بيئة MS على الإكثار الدقيق لنبات *D. cardinale* كما أوضحها (Ohki & Sawaki, 1999).

كلوروفيل أ+ب (ميكروجرام/جم وزن طازج)	الوزن الطازج للأشطاء (ملجم)	عدد الأشطاء/مستاصل نباتى	التركيز فى بيئة MS مليمول		
			NH ⁺ ₄	Fe ³⁺	Mg ²⁺
٣٠٧	٢٨٧.٨	٣.٧	٢٠.٦	٠.١	١.٥
١٤٩٣	٢٣١.٠	٣.٦	٢٠.٦	٠.٢	١.٥
٨٤١	١٧٦.٠	٢.٨	٢٠.٦	٠.١	٢.٠
٦٤٥	٢٨٨.٩	٤.١	١٠.٣	٠.١	١.٥
١٠٢٧	٣٣٣.٣	٤.٩	١٣.٧	٠.١	١.٥

وربما تحتاج بعض المزارع إلى تركيز أعلى من العناصر الصغرى عن الكميات المستعملة فى معظم البيئات مثل MS، فعلى سبيل المثال تطلب تكشف الأشطاء من كالوسات ٥٤ طرز وراثى لنباتات *Glycine max* اضافة أربعة أمثال تركيز العناصر الصغرى للبيئة المشار إليها (Barwale et al., 1986). ويشير Gislrod et al. (2005) إلى أن زيادة تركيز عناصر Fe و Mn و B و Cu و Zn و Mo فى بيئة MS المستخدمة لإكثار أغلب نباتات الزينة سوف يشجع تكوين نباتات ذات جودة عالية. ووجد Bouman & Tiekstra (2005) أن مضاعفة تركيز النحاس ١٦ ضعف تركيزه فى بيئة MS كان له تأثير ايجابى كبير فى نمو العديد من المزارع. وعلى الرغم من ذلك أدى خفض تركيز العناصر الصغرى عدا الحديد فى بيئة MS إلى ظاهرة التميؤ الزجاجى فى القرنفل لكن لم يكن لذلك جدوى فى نباتات *Gerbera*.

وعموماً تزداد حاجة الخلايا لتلك العناصر خلال مرحلة التكشف فقد يتكون الكالس دون تكشف إلا فى وجود تلك العناصر. ولعل من المفيد أن نستعرض الدراسة

التالية عن تأثير تعديل تركيز العناصر المعدنية في بيئة النمو والمعتمد على تحليل أنسجة نبات *Santpaulia ionantha* على استجابتها في مزارع الأسحة وكذلك بعد نقلها إلى الصوبة (Gislerod et al., 2006). فقد تم إكثار النباتات في البيئات الثلاثة المبينة في جدول رقم (٥-٢)، وكررت التجربة ٦ مرات ووضحت النتائج وجود اختلافات كبيرة بين البيئات الثلاثة من حيث معدل النمو في المعمل والبقاء بعد الإقامة وتعدى الأمر ذلك إلى حجم النبات وبدء التزهير في الصوبة. وكانت البيئة المعدلة RS-3 أفضل الثلاث بيئات المختبرة وبدأت النباتات في التزهير بعد ٧١ يوم فقط في حين ازهرت النباتات التي تم إكثارها في بيئة MS المعدلة بعد ١٠٤ يوم (جدول رقم ٦-٢) وبالطبع فإن لميعاد الإزهار وحجم النبات أهمية كبيرة في التسويق التجاري لهذه النباتات بالإضافة إلى خفض فترة بقائها في الصوبة. لكن يجب الحذر فقد تسبب زيادة تركيز العناصر الصغرى عن الحد الأمثل ظهور أعراض السمية على الأنسجة.

١. الزنك

وهو يوجد في جميع أجزاء النبات لأنه عامل أساسي في نشاط العديد من الإنزيمات المسؤولة عن تكوين الكلوروفيل. كما يرتبط إنتاج هرمون أندول حامض الخليك IAA بتوفير الزنك لأنه يدخل في تخليق الإنزيمات الفعالة في تصنيع حامض التربتوفان، والذي يعتبر بادئ لتخليق IAA. ومن ثم فإن النباتات التي تتضح عليها أعراض نقص الزنك تعاني من نقص تخليق البروتين والأحماض النووية والكلوروفيل. ويضاف الزنك لبيئة مزارع الأنسجة بتركيز ما بين ٠.١-٧٠ ميكرومول في صورة سلفات الزنك المائية $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. وقد لاحظ (Hossain et al., 1997) زيادة معدل نمو معلق خلايا الأرز بسبب نشاط IAA عند رفع تركيز الزنك في بيئة النمو إلى ٥٢٠ ميكرومول. وفي مزارع أشطاء *Eucalyptus* كان للزنك أهمية في تكثف الجذور العرضية لكن قد تسبب الزيادة الكبيرة منه تثبيط نمو الجذور (Schwambach et al.,

(2005). ولعل الثباين الكبير في تأثير تركيز الزنك على نمو الجنور راجعاً إلى اختلاف حساسيتها لتأثير IAA.

٢. المنجنيز

يعتبر المنجنيز واحداً من أهم العناصر الصغرى إذ يلعب دوراً في تكوين أغشية الكلوروبلاست، لذا تتضح أعراض نقصه في اصفرار الأوراق. كما ينشط نقص المنجنيز نشاط الكثير من الإنزيمات مثل التيهنروجينيز والديكربوكسيلز. ويتشابه نشاط أيون المنجنيز كثيراً مع الماغنسيوم ويمكن أن يحل محله في تنشيط بعض الإنزيمات، لكن تركيز الماغنسيوم في خلايا النبات أعلى بمعدل ٥٠-١٠٠ مرة من المنجنيز. وقد يستهلك النبات المزيد من أيون المنجنيز بانخفاض الموليبدنيوم والعكس صحيح. ويؤثر وجود أيون المنجنيز على عمليات التمثيل حيث أدى خلو البيئة المستخدمة في زراعة الأوراق الغلافية للنخس إلى انخفاض عدد البراعم المتكونة. وقد يفسر ذلك بأن زيادة تركيز أيون المنجنيز تنشط الإنزيمات المؤكسدة لانتول حامض الخليك IAA وبالتالي انخفاض تركيز IAA بينما لا تتأثر الأوكسينات المصنعة بذلك. وتحتوي معظم النباتات على تركيز ٢٥-١٥٠ ميكرومول من تركيز أيون المنجنيز، والذي يضاف في صورة كبريتات المنجنيز المائية $MnSO_4 \cdot 7H_2O$.

٣. البورون

يقوم البورون بتنشيط العديد من الإنزيمات وانقسام الخلايا والعمل على زيادة مسامية الجدر وانتقال الكربوهيدرات، وبالتالي يحدث تراكم للنشا في حالة نقص البورون. كما أن للبورون أهمية في أيض المركبات الفينولية لنوره كعامل مساعد للإنزيمات المسؤولة عن أيض حامض P-coumaric، ويلتخل البورون في تكوين الحامض النووي الريبوزي RNA والفوائد التكنولوجية اللازمة لانقسام الخلايا وتكوين القمم النامية.

جدول ٥-٢: تركيب ثلاث بيئات استخدمت لإكثار نباتات *S. ionantha* كما وجدها Gislerod et al. (2005).

المركب	التركيز في بيئات (ملجرام/لتر)		
	RS-1997-1	M. et al. (1972)	RS-1997-3
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	١٣٠٠	-	١٢٠٠
NH_4NO_3	٨٠٠	١٦٥٠	٨٠٠
KNO_3	١٢٠٠	١٩٠٠	٨٠٠
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	٤٠	٤٤٠	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	٧٥٠	٣٧٠	٧٥٠
KH_2PO_4	٤٠٠	١٧٠	٣٠٠
NaH_2PO_2	-	١٧٠	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	٣٩٦	-	٢٦٤
$\text{NaFe} \cdot \text{EDTA}$	٤٠	٤٠	٤٠
H_3BO_3	١٨.٦	٦.٢	١٢.٤
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	١٦.٨	١٦.٨	٢٥.٢
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	٨.٦	٨.٦	١.٧٢
KI	٢.٥	٠.٨٣	١.٦٦
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	٠.٧٥	٠.٢٥	٠.٢٥
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	٠.٢٥	٠.٠٢٥	٠.٢٥
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	٠.١	٠.٠٢٥	٠.٠٢٥
EC	٦.٢٧	٦.٤٨	٥.٣٠

ويعتقد أن للبورون دور في ثبات المركبات المخليبية الطبيعية اللازمة لبناء الجدر والأغشية الخلوية ونشاطها الفسيولوجي. لكن يزيد تخليق الكامبيوم ونمو البراعم الجانبية مما يعطى النبات الشكل المتورد بنقص البورن في بيئة النمو.

جدول ٦-٢: تأثير تركيب ثلاث بيئات استخدمت لإكثار نباتات *S. ionantha* على نموها في المعمل وبعد النقل للصوبة (Gislerod et al., 2005).

البيئة	عند النقل (للوعاء)			بعد النقل للصوبة		
	مساحة النبات (سم ²)	تفتح أول زهرة (يوم)	ظهور أول برعم (يوم)	% للبقاء	عدد الأشطاء الجاف (جم)	الوزن
RS-1997-1	١٦١.١	١١٢.٢	١٠٤.٢	٥٠.٤	٤٢	١١.٢
M. et al. (1972)	١٩٨.٢	٩٣.٤	٨٥.٢	٨٧.٥	٤٩.٩	١٤.٢
RS-1997-1	٢٤٥.٥	٨٠.٠	٧١.٦	٨٩.٩	٦٢.١	١٥

يمتص النبات البورون والذي يصل تركيزه في أغلب البيئات إلى ٥٠-١٠٠ ميكرومول في صورة حامض البوريك H_3BO_3 وتؤدي زيادة تركيز البورون عن ذلك إلى ظهور أعراض السمية على الأنسجة المنزرعة. أما في حالة إنبات حبوب اللقاح معملياً وحالات نادرة من مزارع الأشطاء والكالس فإن البورون يضاف بتركيز يصل إلى ٦٤٦ ميكرومول. وباستعمال تركيز ٢٠٠ مليمول من البورن مع ٢.٥ مليمول كالسيوم تمكن (Mohamed et al., 2013) من التغلب على مشكلة موت القمم النامية لنباتات *Haloxylon persicum*. وقد يلعب البورون دوراً مساعداً للأوكسينات في تكشف الجذور (Schwambach et al., 2005) لكن لم يلاحظ تأثيراً للبورون في كشف الجذور على العقل الدقيقة لنباتات *Eucalyptus*. وفي حالة إضافة السكريات الكحولية مثل المانيتول فإن البورون يتحد معها ليكون معقد وتظهر أعراض نقصه بعد فترة لذا يجب استبدال السكريات الكحولية بالسكر بعد فترة من الزراعة لتفادي ذلك.

٤. النحاس

تحتوى النباتات عموماً على تركيز منخفض جداً من النحاس الذى يوجد فى صورة أحادية أو ثنائية التكافؤ حيث يتم أكسدة الصورة الأحادية إلى الثنائية أو اختزال الثنائية إلى أحادية بسهولة داخل الأنسجة. ويرتبط النحاس بعدد من الإنزيمات خصوصاً إنزيمات السيتوكروم مثل السيتوكروم أكسيداز المسئول عن الأكسدة أثناء التنفس وكذلك إنزيمات أكسدة مركبات الفينول كحامض الأبسيسيك ABA والذى يعتبر من مثبطات النمو الطبيعية. وتؤدى أكسدة المركبات أحادية الفينول بالإنزيمات المحتوية على أيون النحاس إلى تكوين الصبغات البنية والسوداء اللون فى بعض مزارع الأنسجة. وهى ظاهرة غير مرغوبة حيث تعتبر هذه المواد سامة للأنسجة وتثبط النمو والتكشاف. ويؤدى نقص النحاس من مزارع الأنسجة إلى تقزم وتشوه النمو. تحتوى بيئة زراعة الأنسجة على تركيز يتراوح بين ٠.١-١٠٠ ميكرومول من النحاس والذى يضاف فى صورة كبريتات النحاس المائية $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. وقد لوحظ أن نقص النترات يسبب انخفاض معدل امتصاص النحاس. وبالنظر إلى محتوى أنات من النحاس يلاحظ الإنخفاض الشديد فى مكونات البيئات المختلفة منه. وعلى هذا لاحظ البعض أن زيادة تركيز النحاس إلى خمس أضعاف التركيز الشائع قد تشجع من النمو (Bouman & Tiekstra, 2005). لكن قد تسبب التركيزات العالية أعراض السمية على المزرعة، وقد شاهد Kumar et al. (2003) انخفاض معدل نمو أشطاء نباتات *Tinospora cordifolia* عند زيادة تركيز النحاس إلى ١٢٥ ملليمول.

٥. المولبيدينوم

يوجد المولبيدينوم بكمية قليلة فى أنسجة النبات على الرغم من دوره المهم فى تمثيل النتروجين واختزال النترات، حيث يعمل كعامل مساعد للإنزيم النتروجيناز والنترات ريدكتيز وتثبيت النتروجين فى النباتات البقولية. ويمتص النبات المولبيدينوم

فى صورة أيون MoO_4^{2-} والذى يضاف إلى مزارع الأنسجة فى صورة موليبدات الصوديوم المائية $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ بتركيز يصل إلى ملليمول واحد، والتركيزات المرتفعة نسبياً والتي تصل إلى ١٠ ميكرومول تكون سامه. أما عند نقص الموليبدنيوم فى البيئة تظهر أعراض التسمم بالنترات على الأنسجة لعدم اختزالها إلى أمونيا.

٦. الكوبلت

يدخل الكوبلت فى تكوين معقد فيتامين B12 الهام فى تثبيت النتروجين. وعلى الرغم أن الكوبلت لا يصنف ضمن العناصر الأساسية فإن أغلب البيئات التى تستعمل فى مزارع الأنسجة تحتوى على تركيز حوالى ٠.١-١ ميكرومول منه حيث يعتقد أن له دور فى تنظيم عملية التكشف. لكن من الصعب الحصول على تأكيد لدور الكوبلت فى تكوين الأحماض الأمينية فى مزارع الأنسجة (George & De-klerk, 2008). وقد ترجع أهميته فى مزارع الأنسجة إلى تثبيت بعض عمليات الأكسدة التى تتم بوجود الكوبلت أو الحديد وكذلك تثبيط إنتاج غاز الإثيلين. ويضاف الكوبلت فى صورة كلوريد الكوبلت المائى $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ بتركيز حوالى ٠.٠٢٥٠ ملجم/لتر.

٧. اليود

ليس من المعتاد اعتبار اليود عنصراً أساسياً لنمو النبات رغم وجوده فى بعض الأحماض الأمينية ودوره فى نمو الجذور ربما لنشاطه كعامل مختزل. وقد أدت زيادة تركيز اليود من ٠.٠٠١-٠.٥ ميكرومول إلى منع اسوداد مزرعة نخيل جوز الهند وتحسين نمو الكالس. وعلى ذلك أضيف اليود إلى حوالى ٦٥% من البيئات التى استخدمت فى مزارع الأنسجة فى صورة يوديد البوتاسيوم أو أى صورة أخرى مثل Iodeacetate حيث يتحرر منها اليود بالتحلل المائى. لكن لم يسجل تأثير سلبي على نمو الكثير من مزارع الأنسجة باستعمال بيئة خالية منه.

٨. النيكل

لم يكن هناك إدراك لأهمية النيكل والألومنيوم لمزارع الأنسجة عند تحديد تركيب معظم البيئات التي استعملت في مزارع الأنسجة لكن أشار Gerendas *et al.* (1999) إلى ضرورة النيكل للنمو لأنه يدخل في نشاط إنزيم اليوريز الذي يحول اليوريا إلى الأمونيا وبالتالي يحسن من نمو أشطاء البطاطس (Witte *et al.*, 2002). كذلك لوحظ تحسن في النمو واستجابة الأنسجة المنزرعة من النباتات البقولية عند إضافة النيكل لمزارع أنسجة البقوليات. ولا يضاف النيكل مباشرة إلى مزارع الأنسجة إلا أنه يوجد كشوائب في الأجار المستعمل لتصلب البيئة.

٩. الكلوريد

يلعب الكلوريد وهو من الأيونات المتحركة في النبات دوراً في تنشيط بعض العمليات الفسيولوجية مثل المحافظة على ضغط الامتلاء واللاتزان الأيوني كذلك البناء الضوئي، لكن آلية هذا التنشيط غير معروفة على وجه الدقة. وتحتاج النباتات إلى كميات قليلة جداً من الكلوريد لكنها قد تتحمل تركيزات عالية نسبياً دون ظهور أعراض التسمم. والتركيز الشائع استخدامه في مزارع الأنسجة من الكلوريد هو ٣ ميكرومول وقد يصل إلى ٦ ميكرومول في حالة زراعة الأعضاء المتكشفة. وتؤدي التركيزات العالية منه خصوصاً في أنسجة الأشجار المنزرعة معملياً إلى اصفرار الأوراق وضعف السوق وظاهرة التميؤ الزجاجي والتي تزول بخفض تركيزه. وقد حاول البعض إزالة الكلوريد من البيئة ولكي يتم ضبط الاتزان الأيوني استعملت SO_4^{2-} بتركيز أعلى حيث زادت كمية سلفات الأمونيوم بدلاً من كلوريد الأمونيوم وبذلك زاد تركيز السلفات من ١:١٦ ميكرومول لكن سبب ذلك تأثير غير مرغوب.

١٠. الحديد

للحديد قدرة عالية على التأكسد والاختزال داخل النبات، وبذلك له تأثيرات فسيولوجية مهمة فيدخل في نشاط عديد من الإنزيمات خصوصاً النشطة في عمليات التنفس. وعلى الرغم من عدم اشتراك الحديد في تركيب الكلوروفيل إلا أنه مهم في تكوينه والحفاظ عليه، حيث يشترك الحديد في تكوين بروتينات الحديد ferredoxin protein وهي الناقله للإلكترونات في عملية البناء الضوئي. وكان الحديد في بداية استعماله في بيئات زراعة الأنسجة وقبل استخدام المركبات المخلبية يضاف في صورة Fe^{2+} أو Fe^{3+} باستعمال سلفات الحديدوز أو طرطرات الحديدك. ورغم الخصائص المخلبية لحامض الستريك والطرطريك فلم يحققا حفظ الحديد في صورة ميسرة للأنسجة في البيئة. حيث لا ينفرد الحديد مرة أخرى بعد ارتباطه بهما إلا إذا تم خفض الرقم الهيدروجيني وهو الأمر غير المتاح في المزرعة خصوصاً في الظروف الهوائية. وباكتشاف واستخدام المركبات المخلبية في مزارع الأنسجة في الخمسينيات لوحظ تحسن في النمو وتكوين الأفرع في بيئات عديدة كان من غير الممكن استعمالها للتكثف. ولهذا أصبح الحديد لا يضاف إلا في الصورة المخلبية المعروفة ومنها EDTA و EGTA و EDDAH و DTPA. وعلى الرغم أن الحديد يتم امتصاصه في الصورة الحرة كمركب غير معقد من المركبات المخلبية إلا أن هناك تأكيدات أن المركبات المخلبية نفسها تمتص بواسطة الأنسجة المنزرعة.

وعند التركيزات المنخفضة وجد تأثير متشابه لمركب EDTA مع الأوكسينات وقد فسر ذلك بارتباط العامل المخلبي مع الكالسيوم في الجدار الخلوي، أو أن نشاط IAA كأوكسين يرجع لقدرته على الارتباط ببعض الأيونات وبذلك يتشابه مع المركبات المخلبية. ومعقد Fe(III)-EDTA ثابت عند الرقم الهيدروجيني ٢-٣ لكن بارتفاع الرقم الهيدروجيني عن ذلك (كما هو الحال في بيئات زراعة الأنسجة) يتحرر بعض الحديد

ويترسب في صورة معقد مع الفوسفات، ويرتبط المركب المخلبي مع بعض الأيونات الأخرى فتصبح غير ميسرة. وقد توصل Teasdale (1987) إلى أن كل النحاس وأغلب الزنك تقريباً وبعض المنجنيز المضاف إلى البيئة يصبح مرتبطاً بالمركب المخلبي. ولم يكن من الواضح عدم تيسر تلك العناصر في هذه الحالة إلا أن عدم ظهور أعراض النقص على المزرعة يشير إلى إمكانية امتصاصهما. لكن من الضروري الإشارة إلى عدم إضافة أكثر من ٠.١ مليمول من EDTA لتجنب أعراض سميّتها على بعض النباتات. وقد لاحظ Ohki & Sawaki (1999) زيادة معنوية في كمية الكلوروفيل الكلي (أ+ب) في أوراق الأشطاء المتكشفة من زراعة أجزاء من الحامل النورى لنبات *Delphinium cardinale* عند رفع تركيز الحديد في بيئة MS إلى الضعف مع خفض تركيز الأمونيا وزيادة النترات وذلك للمحافظة على التركيز الكلي للنتروجين المعدني عند ٦٠ ميكرومول. ويوضح جدول رقم (٢-٧) تأثير تركيز الحديد والأمونيا على كمية الكلوروفيل في الأوراق.

وللفهم النباتي المستعمل في مزارع الأنسجة قدرة متباينة على امتصاص بعض المركبات المخلبية المختلفة، لذا أشار Dimassi et al. (2003) و Zawadzka (2006) & Orlikowska أن استخدام FeDDHA أفضل من FeEDTA. كذلك زرع Salm et al. (1994) العقد الساقية لصنف الورد Moneyway الذي يستعمل كأصل للتطعيم في بيئات MS و Quoirin and Lepoivre (QL) و WP مع استعمال EDTA أو EDDHA في بيئتي MS و QL كمصدر للحديد. وقد وجد أن EDDHA يساهم في التغلب على الأصفرار وانخفاض محتوى الكلوروفيل مع زيادة في طول الأشطاء بالرغم من عدم تأثير الرقم الهيدروجيني حتى بعد ٦ أسابيع من الزراعة. ويرجع Gislerod et al. (2005) ذلك إلى حساسية EDTA للضوء فربما تسبب زيادة شدة الإضاءة إلى ظهور أعراض نقص الحديد عند استعمال EDTA بدلاً من EDDHA.

جدول ٧-٢: تأثير تركيز الأمونيا والحديد في بيئة MS على تركيز الكلوروفيل في أوراق نباتات *Delphinium cardinale* الناتجة من الإكثار الدقيق (Ohki & Sawaki, 1999).

تركيز NH_4^+ (مليمول)	تركيز Fe^{3+} (ميكرومول)	كمية الكلوروفيل أ+ب (ميكروجم/جم طازج)
٢٠.٦	٠.١	٦٨٠
١٠.٣	٠.١	٩٨٦
١٠.٣	٠.٢	١٢٢٩
١٣.٧	٠.١	٧٢٥
١٣.٧	٠.٢	١٠٣٢

تشجع EDTA نمو جذور النباتات الناتجة في زراعة الأنسجة في الظلام وتفقد الجرعات المنخفضة من EDTA هذا النشاط بإضافة تركيز أيون الحديد. وفسر ذلك بأن أيون الحديد يرتبط مع EDTA ليحرر كاتيوناً آخر كان مرتبطاً بها يسبب تثبيط تكوين الجذور. وكما أن التركيزات العالية من EDTA تسبب سمية للنباتات النامية في المحاليل المغذية فإنها تسبب سمية أيضاً في مزارع الأنسجة وتقلل من عدد الأشرطة المتكشفة، وقد تثبط تكوين الأشرطة تماماً. وفسر ذلك بأن أيون الحديد المنفرد من EDTA يسبب ترسيب الفوسفات واصفرار الأوراق والذي يزول بإضافة ٦.٤ مليمول من H_2PO_4 .

ثانياً: المواد العضوية

المركبات العضوية هي تلك المحتوية على كربون كالكربوهيدرات، البروتين، الفيتامينات والهرمونات. وهذه المركبات لا تضاف إلى النباتات النامية في الحقل حيث لها القدرة على تخليقها في عملية البناء الضوئي أو من نواتجها خلال عمليات الأيض

المختلفة. لكن الأنسجة المنزرعة معملياً والنباتات الناتجة منها إما أنها تكون صغيرة جداً أو غير قادرة على تكوين مستلزماتها من المواد العضوية لعدم توفر الظروف البيئية الضرورية لذلك. وعلى هذا لوحظ تحسن واضح في النمو والتكشف في مزارع الأنسجة بإضافة هذه المواد إلى بيئة النمو. وتشمل المواد العضوية المضافة لمزارع الأنسجة كما بينتها العديد من المراجع أهمها (1987) Pierik و Thorpe *et al.* (2008) ما يلي:

أ. الفيتامينات

في البداية كانت بعض المواد غير محددة التركيب كلبن جوز الهند، وعصير الطماطم، ومستخلص الخميرة، والكازين المتحلل تضاف لمزارع الأنسجة كمصدر للمواد العضوية. وبالطبع تعتبر تلك المواد مصدر كافٍ لحاجة المزرعة من الفيتامينات، لكن بالإقلال من استخدام هذه المواد والاستعاضة عنها بمركبات ذات نقاوة عالية ظهرت أهمية إضافتها لبيئات النمو. ومن الفيتامينات التي تضاف إلى معظم البيئات (B1) thiamin و (niacin) nicotinic acid و (B6) pyridoxine وكذلك myo-inositol. ولكي يقال أن أحد الفيتامينات ضرورياً لنمو مزارع الأنسجة لابد من التأكد من ذلك بإجراء العديد من الدراسات. وبينت الدراسات أن بعض الفيتامينات التي استعملت في تركيب البيئات الشائعة يمكن أن تستبعد دون التأثير على النمو. فبالرغم من أن بيئة MS تحتوي على أربعة فيتامينات فإن نمو خلايا كالوسات الدخان لم يتأثر عند استعمال الميوانزيتول والثيامين فقط ولم يكن لحامض النيكوتينك والجليسين والبيرودكس تأثير على النمو. والفيتامينات التي تضاف غالباً إلى مزارع الأنسجة هي:

١. الميونسيتول Myo-inositol

يعتبر الميونسيتول أحد مكونات فيتامين ب وهو عبارة عن سكر كحولي تابع لمجموعة مركبات a-stereoisomers وله نشاط حيوي هام لنمو الخميرة وكذلك

الخلايا القديمة في مزارع الأنسجة النباتية. ويعتقد أنه هام في تخليق البكتين والهيميسلوليز وبالتالي تخليق الجدر الخلوية. وربما يلعب دوراً في امتصاص بعض الأيونات، حيث زاد امتصاص الكالس لايونات الفوسفات بزيادة تركيز الفيتامين إلى ٤ جم/لتر. وقد يضاف الميوانسيتول في بعض البيئات كمصدر للكربوهيدرات وتتباين حاجة مزارع الأنسجة للميونسيتول على أساس قدرتها على تخليقه، فالأنسجة لها قدرة على تخليقه عكس الأنسجة غير المتكشفة التي لها قدرة بسيطة على النمو دون إضافته للبيئة، ويعتقد البعض أن هذا الفيتامين ضروري لنمو بعض النباتات خاصة أحادية الفلقة ويعوض نقصه باستعمال لبن جوز الهند أو مستخلص الخميرة. ويضاف الميونسيتول إلى البيئة بكميات كبيرة نسبياً تصل إلى ١٠٠ ملجم/لتر. وقد أشار Vahdati et al. (2008) إلى أنه يمكن تحسين النمو وزيادة معدل التحذير حتى ٧٠% لنباتات الجوز *Juglans regia* برفع تركيز الميوانسيتول إلى ضعف تركيزه في بيئة DKW مع زيادة تركيز النحاس عشر مرات، لكن ارتبط ذلك بالصنف النباتي.

٢. الثيامين (B1) Thiamine

يعتبر الثيامين $C_{12}H_{17}ON_4SC$ من المجموعات الفعالة لبعض إنزيمات دورة كريس، كما يساهم مباشرة في تكوين بعض الأحماض الأمينية وهو أكثر الفيتامينات استخداماً في مزارع الأنسجة. وتزيد الحاجة إلى الثيامين بتقدم المزرعة في العمر أو بإجراء نقل جديد للمزرعة إلى بيئة جديدة حيث يعنى ذلك انخفاض المحتوى الداخلى للنسيج منه. فقد انخفض معدل نمو معلق خلايا الذرة تدريجياً ثم ماتت بعد تجديد الزراعة ثلاث مرات عندما كانت البيئة خالية من الثيامين. وربما يكون للثيامين بعض التأثيرات المشتركة مع السيوكينينات، فقد وجد أن زيادة تركيز Kinetine تسبب تكوين كمية كافية من الثيامين في كالوس الدخان لكن بانخفاض تركيز منظم النمو تفشل الخلايا في النمو والانقسام. وأوضح Barwale et al. (1986) أن تركيز الثيامين في

بيئة MS والذي يبلغ ٠.٣ ميكرومول غير كافى لتكوين الأجنة الجسدية عند زراعة الأجنة الزيجوتية لنبات *Glycine max* وزاد معدل عدد المُستأصلات النباتية القادرة على تكوين الأجنة الجسدية من ٣٣% إلى ٥٨% عند رفع التركيز إلى ٥ ميكرومول. وزادت تلك النسبة إلى ٧٦% عند اضافة ٤ ميكرومول من حامض النيكوتينك.

٣. حامض النيكوتينك Nicotinic acid

يدخل حامض النيكوتينك كعامل مساعد للإنزيمات المسنولة عن التفاعلات الضوئية ويضاف إلى البيئة بتركيز ٠.١-١٠٠ ملجم/لتر. كما قد تحتوى البيئات أيضاً على البيروكسين، حامض الفولك، الكولين.

ب. الأحماض العضوية

قد تضاف بعض الأحماض العضوية مثل الستريك، المالك، السكسك إلى بيئات مزارع الأنسجة وذلك لأدوارها التالية:

- **دور مخلبى:** توجد بعض الأحماض العضوية الثنائية التكافؤ مثل الستريك والمالك والمالونك فى خشب بعض النباتات حيث تتحد مع بعض الأحماض الأمينية والأيونات لتكون معقد يساعد على الانتقال فى النبات. كذلك قد تفرز هذه الأحماض فى البيئة وتساعد على تيسر الحديد غير المخلبى فتعالج أعراض نقص الحديد.
- **دور مغذى:** يزداد أيض الأمونيا بإضافة أحماض دورة كربس للبيئة. وقد أمكن بإضافة malic acid و fumaric acid و sodium pyruvate و potassium pyruvate إلى بيئة النمو زراعة بعض الخلايا بكثافة منخفضة عن الكثافة اللازمة فمثلاً يتطلب زراعة المعلق الخلوى حد أدنى من كثافة الخلايا فى البيئة. وقد لا تتحمل الخلايا اضافة التركيزات العالية من الأحماض العضوية التى تسبب زيادة الحموضة فمزارع منك التريتیکال تنمو فى بيئة N6 باضافة ٣٥ ملجم/لتر من بيروفيات الصوديوم وحامض المالك والفيوماريك، لكن ثبت النمو عند رفع التركيز إلى ١٠٠ ملجم/لتر. ويمكن التغلب على ذلك بإضافة الأحماض العضوية فى صورة أملاح الصوديوم أو البوتاسيوم حيث تعادل الكاتيونات

الأنيونات وبذلك يمكن إضافة كمية كبيرة من الأحماض العضوية دون ظهور أعراض التسمم. ويتراوح تركيز أملاح الصوديوم والبوتاسيوم لهذه الأحماض في معظم البيئات بين ٣٥ إلى ١٤٠ ملليجرام/لتر. وقد شجع Ramming (1990) نمو مزارع أجنة الخوخ بإضافة ٥ مليمول من سكسينات البوتاسيوم لبيئة النمو.

• **تنظيم الرقم الهيدروجيني:** على الرغم من اعتبار الأحماض العضوية ثلاثية الكربوكسيل مصدر للنتروجين العضوى فإنها تعمل بتركيزات عالية تصل إلى ١٠٠ ملجم/لتر على ثبات الرقم الهيدروجيني في مزارع البروتوبلاست لكنها لم تكن فعالة بيولوجيا كالمنظمات الأخرى.

ج . الأحماض الأمينية

ربما تضاف الأحماض الأمينية لبيئة النمو لإستيفاء حاجة المزرعة من النتروجين المختزل، لكن نظراً لارتفاع ثمنها فلا تضاف إلى مزارع الإكثار الدقيق إلا إذا كان هناك تحسين ملحوظ في معدل النمو والتضاعف. وغالباً لا تضاف تلك الأحماض لمعظم مزارع الأنسجة على أساس أن البيئة تحتوى على التركيز الأمثل من النتروجين بصورتيه. وبينت التجارب الأولية لزراعة الأنسجة على يد موراشيغ وسكوج تحسن نمو مزارع كالوس الدخان بصور واضحة بإضافة لبن جوز الهند والكازين المتحلل، وقد أرجع السبب بصورة جزئية إلى الأحماض الأمينية. كذلك أوضحت بعض الأبحاث التأثير الإيجابى للارجنين بتركيز ٠.٢٧٨ مليمول على نمو معلق خلايا قصب السكر. ويتضح من الدراسات التى استخدمت الأحماض الأمينية أن تأثيرها كان فعالاً على النمو والتكشف فى البيئات ذات المحتوى المنخفض من الأمونيا. وأشار (1990) Grimes & Hodges إلى أن تأثير الأحماض الأمينية يتوقف على النسبة بين تركيز النترات والأمونيا فى حالة إحتواء البيئة على الصورتين. ويجب الإشارة إلى أن الصورة اليسارية فقط L-isomers أو α -amino من الأحماض الأمينية هى الفعالة حيويًا.

يمكن للأحماض الأمينية أن تمد الخلايا بصورة ميسرة سهلة الامتصاص من النتروجين بالمقارنة مع النتروجين غير العضوى (Thom *et al.*, 1981)، وقد تمتص لتعويض النقص فى الفوسفور. لكن ربما يتبادر إلى الذهن السؤال التالى: إذا كان النتروجين المعدنى المضاف إلى البيئة يتم تحويله فى النبات إلى أحماض أمينية ليدخل فى تخليق البروتين فلماذا لا يضاف النتروجين فى هذه الصورة مباشرة، وبذلك يمكن توفير الطاقة التى تستهلكها الخلية فى تخليق الأحماض الأمينية من الأمونيا؟ وبالفعل استطاع Muller & Grafe (1978) زراعة كالوس الدخان فى بيئة MS الخالية من النتروجين عند زيادة تركيز البوتاسيوم إلى ٢٠.٦ مليمول وإضافة أحماض الجليسين والأرجنين والأسبارتك بتركيز ٠.١ و ١ و ٢ مليمول على التوالى.

لكن بسبب امتصاص الأحماض الأمينية زيادة حموضة البيئة وضرورة وجود محلول منظم للرقم الهيدروجينى أو إعادة ضبطه باستمرار. والسبب الآخر هو اختلاف استجابة النباتات للأحماض الأمينية. وعلى العكس من باقى الأحماض الأمينية يعتبر الجليسين من المركبات المستعملة لتحضير معظم مزارع الأنسجة حيث يضاف بتركيزات متباينة لتدعيم نمو الأشطاء ويصنف أحيانا ضمن الفيتامينات. وبالرغم من الاستعمال الواسع للجليسين كأحد مكونات البيئة يصعب وجود تأكيد قوى لدوره فى البيئة، لكنه قد يحمى الأغشية الخلوية من الإجهاد الاسموزى والحرارة (Orczyk & Malepszy, 1985). وبالرغم أن الأحماض الأمينية ليست ضرورية للنمو فإن الميثونين حالة مختلفة حيث لاحظ Druart (1988) أن إضافة ٥٠-١٠٠ ملجم/لتر من الميثونين يزيد من فاعلية السيوكينين وبالتالى زاد معدل تضاعف لأشطاء *Prunus glandulosa* وقد فسر ذلك بدور الميثونين كبادئ فى تخليق الإثيلين. ويشير Bister (1985) إلى دور الجلوتامين الإيجابى فى نمو الخلايا بزراعة المعلق الخلوى الذى يعانى من نقص الفوسفات وذلك عندما أضيف الكازين المحلل للبيئة.

د. السكريات كمصدر للطاقة

الكربوهيدرات مكون هام جداً في بيئة زراعة الأنسجة كعامل ضروري للنمو، وذلك لأن ناتج عملية البناء الضوئي - إن تمت- يكون غير كافى للنمو فالظروف البيئية غير مواتية لإتمام هذه العملية. لكن في بعض المزارع أصبحت بعض السلالات الخلوية cell lines ذاتية التغذية أى يمكنها تثبيت ثانى أكسيد الكربون كمصدر للطاقة، وينخفض معدل نمو هذه الخلايا بانخفاض ثانى أكسيد الكربون فى الوسط المحيط الغازى. ونظراً لأهمية ذلك من الناحية الاقتصادية والعملية تعددت الدراسات بهدف دفع الخلايا والنباتات فى مزارع الأنسجة لتصبح ذاتية التغذية. وذلك باستخدام تركيزات مرتفعة من ثانى أكسيد الكربون وكثافة ضوئية عالية مع خفض تركيز أو حذف السكر بالكامل من البيئة (Kozai, 1991). لكن يجب ملاحظة أن السكر يعمل على تثبيط تكوين الكلوروفيل وعملية البناء الضوئي جاعلاً نمو الخلايا الذاتية التغذية غير ملحوظ، وسيتم الحديث بالتفصيل عن المزارع ذاتية أو خليطة التغذية الضوئية لاحقاً.

وقد أشار Koch (1996) إلى دور الكربوهيدرات فى تنظيم التعبير الجينى بتنشيط أو تثبيط بعض الجينات. وعلى هذا فمن الضروري إضافة مصدر كربونى للبيئة، وغالباً يستخدم السكر أو بعض البدائل الأخرى كمصدر للطاقة. ويمتص السكر فى مزارع أنسجة الجزر بطريقة الانتقال السلبي وقد يمتص جزء منه بالانتقال النشط. ولما كان السكر هو المركب الكربوهيدراتى السائد فى عصارة لحاء معظم النباتات فإن معظم البيئات تحتوى عليه كمصدر للطاقة. لكن من الثابت عملياً أن انزيم الانفرتيز المتحرر من بعض الأنسجة المنزرعة معملياً يعمل على تحلل السكر إلى جلوكوز وفركتوز أى أن البيئة تصبح محتوية على الثلاثة أنواع من السكريات (De Klerk & Calamar, 2002). وفى بعض الأشجار خاصة تلك التابعة للعائلة الوردية يعتبر

السوربيتول هو السكر السائد في اللحاء وعلى هذا يكثر استعمال تلك الأنواع من الكربوهيدرات في مزارع الأنسجة.

وعموماً يعتبر السكر أنسب مصدر للطاقة يليه الجلوكوز الذي يعطى تأثير مشابه للسكر لكن نظراً لارتفاع سعره فلا يستعمل إلا في الحالات التي قد يفوق تأثيره فعل السكر كحالات تكشف النباتات، لكن يتوقف ذلك على نوع النبات والمستأصل المنزوع. فقد وجد (Phillips & Hubstenberger 1985) أن الكشف المباشر للأشطاء من الأقراص الورقية لنبات *Capsicum annum* يتطلب وجود الجلوكوز. ويلى الجلوكوز كمصدر للكربوهيدرات المالتوز ثم الرافينوز، أما الفركتوز فأقل تأثيراً من المجموعة السابقة، ويعتبر المانوز واللاكتوز غير مناسبين لزراعة الأنسجة. واستعمل (Luo et al. 2009) الجلوكوز والسكروز والمالتوز والفركتوز بتركيز يتراوح بين ٥ و ٤٠ جم/لتر في بيئة MS بغرض كشف الأشطاء من كالس نباتات *Dendrobium huoshanense*.

ووجد أن الفركتوز غير مناسب على الإطلاق لتكوين الأشطاء بينما زاد عدد الأشطاء باستعمال المالتوز خاصة عند تركيز ١٠ جم/لتر ثم السكروز وكان عدد الأشطاء المتكشفة عند استعمال الجلوكوز منخفض جداً. وقد يرجع تفوق المالتوز على السكروز في هذه الحالة إلى بقاء تحلل وامتصاص المالتوز. ويفترض (Jheng et al. 2006) أن النقص في السكر المتاح هو المحفز لعملية الكشف في حين يعتقد (Krogstrup et al. 2005) أن الدور المحفز للمالتوز ربما يرجع إلى تأثيره على الضغط الأسموزي للبيئة. كذلك درس (Shatnawi et al. 2006) تأثير مصادر مختلفة للكربون على كشف ونمو أشطاء نباتات *Pyrus sayriaca* باستعمال بيئة MS، ويبين جدول (٢-٨) أن السكروز شجع تكوين أشطاء عرضية يصل عددها إلى ٦.٨ أما الجلوكوز والفركتوز فقد شجعا نمو البرعم الإبطية فقط.

ويكثر استعمال المالتوز فى مزارع المند خاصة للنباتات النجيلية فقد استعمل لتسريع انقسام الخلايا وإنتاج الكالس من زراعة الخلايا الأمية للأرز، كما زاد عدد النباتات الخضراء لنباتات الشعير عندما استعمل المالتوز فى مزارع الخلايا الأمية. وقد فاق تأثير المالتوز السكر فى إنتاج الأجنة الجسدية للعديد من الأنواع النباتية من مثل الكرز البرى والصنوبر وغيرهما (Reidiboym-Talleux *et al.*, 1999). ورغم الاستعمال الشائع للسكروروز فى بينات الإكثار فإن النتائج السابقة وتلك التى وجدها البعض مثل Krogstrup *et al.* (2005) و Gemas & Bessa (2006) و تشير إلى مدى أهمية دراسة مدى ملاءمة المالتوز لنمو مزارع الأنسجة، أما الجلاكتوز فقد يكون ساماً لبعض المزارع لكنه بتركيز منخفض قد يقلل من ظاهرة التميؤ الزجاجى. وأظهرت بعض الدراسات دوره الإيجابى ، حيث يشجع انضاج الأجنة الجسدية (Schuller & Reuther, 1993) وتكوين الجذور على نباتات *Annona squamosa* فى دراسة (Lemos & Blake 1996) ربما تستخدم بعض أنواع شراب الذرة المحتوى على جلوكوز ومالتوز والسكريات العديدة كمصدر للكربون حيث أدت إضافته تكشف أعضاء لم تتحقق باستعمال السكر. كذلك ساعد فى تكوين أجنة جسدية من طرز خلايا غير جنينية لكالوس نباتات الجزر عمرها ٥-١٠ سنوات. وتجدر الإشارة إلى أنه يمكن أن تتحلل بعض السكريات الأحادية كالأرامنوز، الزيلوز، والثنائية كالمالتوز إلى جلوكوز وفركتوز عند اضافتهم للبيئة. وليس من الطبيعى دخول السكريات الكحولية فى عمليات الأيض داخل النبات. لكن قد يستعمل المانيتول وهو سكر خامل والسوربتول لزيادة الضغط الاسموزى للبيئة وفى هذه الحالة لا بد من إضافة كمية من السكر لتوفير الطاقة، ومن الجدير بالذكر أن إضافة المانيتول والسوربتول يجعلان البورون غير ميسر.

جدول ٨-٢: تأثير مصادر مختلفة من الكربوهيدرات على نمو نبات *Pyrus sayriaca* في بيئة MS تحتوى على ١ ملجم/لتر BA و ٠.١ ملجم/لتر IBA (Shatnawi et al., 2006).

مصدر الكربون	التركيز (%)	عدد الأشرطة	طول الأشرطة (مم)	الوزن الطازج (جم)	الوزن الجاف (جم)
سكروز	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠٠٠	٠.٠٠٠
	١.٥	٦.٨	٧٨.٦	٠.٧٠٣	٠.١٣٦
	٣.٠	٤.٦	٦٧.٠	٠.٧٧٤	٠.١٣٩
	٤.٥	٢.٦	٥٣.٠	٠.٣٩٠	٠.١٠٨
	٦.٠	١.٨	٣٩.٤	٠.٢٩٤	٠.٠٧٦
فركتوز	٠.٠	١.٠	١٩.٨	٠.١٥٤	٠.٠١٢
	١.٥	١.٠	٣١.٢	٠.٥١٩	٠.٠٨٩
	٣.٠	١.٠	٢١.٦	٠.٤٣٦	٠.٠٦٧
	٤.٥	١.٠	٢٣.٢	٠.٣٤٩	٠.٠٦٤
	٦.٠	١.٠	١٩.٨	٠.١٢٥	٠.٠٤٤
جلوكوز	٠.٠	١.٢	٣٦.٦	٠.٢٤٥	٠.٠٦٠
	١.٥	١.٢	٣٢.٤	٠.٢٥٥	٠.٠٧٩
	٣.٠	١.٤	٢٨.٠	٠.٣٥٥	٠.٠٣١
	٤.٥	١.٠	٢٤.٠	٠.٢٠٥	٠.٠٦٣
	٦.٠	١.٢	٢٣.٠	٠.١٩١	٠.٠١٦

التحلل المائي للسكر

مما لا شك فيه أن تركيز السكر من العوامل المؤثرة على النمو والتكشف في مزارع الأنسجة. وقبل أن نستعرض ذلك لابد أن نشير إلى أن جزء من أو كل السكر المضاف للبيئة يتحلل مائياً إلى مكوناته من السكريات الأحادية من الجلوكوز والفركتوز ويحدث هذا أيضاً للسكر بعد امتصاصه كي يدخل في عمليات الأيض. ولاحظ (Kromer & Kukulczanka, 1985) زيادة معدل بقاء القمم الميرستيمية لنباتات *Canna indica* بإضافة ٢٥ و ٥ جم/لتر من الجلوكوز والفركتوز على التوالي بدلاً من ٣٠ جم/لتر سكر. لكن لم يكن لتلك السكريات الأحادية نفس الدور المحفز للسكر لتطويع الأجنة الجسدية لنباتات *Pseudotsuga menziesii* طبقاً لملاحظات (Taber et al., 1998). وقد سجل (De Reik et al., 1997) تحلل السكر في البيئة المستعملة لزراعة *Rosa multiflora* في مرحلتى التضاعف وتكوين الجذور.

وتؤدي عملية التعقيم بالأوتوكلاف إلى التحلل المائي لبعض السكر ويزيد هذا التحلل إذا أضيف السكر إلى باقى محتويات البيئة مقارنة بتعقيم السكر بمفرده. ويؤثر الرقم الهيدروجيني للبيئة على مدى تحلل السكر، حيث يزيد ذلك بانخفاض الرقم الهيدروجيني وقد قدر أن ١٠-١٥% من السكر يتم تحلله مائياً إلى جلوكوز وفركتوز عندما يكون الرقم الهيدروجيني ٥.٥ : ٥.٨. وقد وجد أن الخلايا تنمو بدرجة أحسن في بيئة معقمة بالأوتوكلاف بالمقارنة مع تلك المعقمة بالمرشحات وأرجع ذلك للتحلل المائي للسكر (Thorpe et al., 2008).

لكن من الصعب الإجابة على سؤال هل التعقيم بالأوتوكلاف مرغوب أم لا لبيئة مزارع الأنسجة؟ لتعارض الكثير من الأبحاث حول ذلك، ويبدو أن للطرز الوراثة دوراً في تلك الاستجابة. وبالإضافة إلى التحلل المائي للسكر يتم أيضاً تكسيره إلى سكريات أحادية كالجلوكوز والفركتوز أثناء الزراعة ببعض الإنزيمات مثل الانفرتيز

الموجود في الجدر الخلوية أو بالإنزيمات المتحررة من الخلايا ويتوقف ذلك على النوع النباتي. وقد وجد (Zamski & Wyse, 1985) أن كل السكر المضاف إلى بيئة قصب السكر يتحلل مائياً خلال ثلاثة أيام. كما أن لدرجة حرارة المزرعة تأثير على تحلل السكر المضاف فقد تأثر نمو جذور الطماطم المنزرعة في البيئة بتركيز السكر، لكن ارتباط الاستجابة بدرجة حرارة البيئة. حيث أدى تغير درجة الحرارة عن ٢٨° م إلى التأثير على نشاط إنزيم الإنفرتيز الذي أثر بدوره على معدل النمو. لكن أدى انخفاض درجة الحرارة إلى انخفاض معدل النمو على الرغم من أن نشاط الإنزيم ظل عالياً.

تأثير السكر على مزارع الأنسجة

اهتمت العديد من الأبحاث بتقدير التركيز المناسب للسكر في مزارع الأنسجة خاصة فيما يتعلق بنمو الأفرع والأجنة الجسدية، ولم يكن هناك اهتمام كبير بدراسة تأثيره على الأنسجة غير المتكشفة. وبالطبع فإن التركيز الأمثل لنمو الكالس ليس هو نفسه المناسب لنمو الأفرع المتكشفة. ويتوقف هذا التركيز على عوامل منها النوع النباتي، الجزء المنزرع، عمر المزرعة، باقى مكونات البيئة، فقد يسبب التركيز المرتفع نسبياً بنسبة تصل إلى ٤.٥% ظهور أعراض التميؤ الزجاجي في بعض النباتات كالقرنفل بينما يشجع النمو والتكشف في نباتات أخرى (Ziv, 1991). وقد لا تزيد استفادة المزرعة من زيادة تركيز المكونات الغذائية للبيئة إلا إذا زاد تركيز السكر، فمثلاً لا يتضح تأثير التركيز المرتفع من النتروجين في عملية الكشف إن لم تحتوى البيئة على تركيز مناسب من السكر. وقد تأثر امتصاص مزارع نبات *Dendrobium* للنترات والأمونيا من البيئة بتركيز ونوع السكر المضاف. وقد لا يكون التركيز المناسب لإبقاء الأجزاء المنزرعة حية وتكوين الأشطاء مناسباً لتكوين الجذور على النباتات المتكشفة، ففي تجربة لإكثار نباتات *Lilium longiflorum* باستعمال أجزاء من الساق كان تركيز ٣-٤% من السكر فعال جداً في كشف البراعم لكن لم تتكون جذور على النباتات المتكشفة حتى بعد ٩٠ يوماً من الزراعة. لكن بخفض

التركيز إلى ٢% كان عدد الأشطاء المتكون أقل قليلاً كما يبين جدول رقم (٢-٩) لكن تم استحداث عملية التجذير بعد ٦٠ يوم من الزراعة. ويتضح من الجدول مدى تأثير السكر على نجاح مرحلة تأسيس المزرعة.

وفي دراسة على نمو البراعم العرضية وتجزير افرع *Ficus carica* يبين شكل رقم (٢-٣) تأثير النمو الخضري وطول وعدد الجذور بعد ثلاثة اشهر من زراعة العقل الساقية في بيئة MS تحتوى على صفر و ١٥ و ٣٠ جم/لتر. وفي دراسة قام بها (2002) Carelli & Echeverrigaray لإكثار صنف الورد Baronesse بالبراعم الجانبية استعمل المانيتول والسريبيتول والجلوكتوز والجلوكوز كمصدر للسكر.

ووجد أن الجلوكوز والسكر هما الأفضل من حيث عدد الأشطاء المتكشفة وطول الأشطاء. وعلى الرغم من عدم وجود اختلافات بين تأثير التركيزات المختلفة من السكر فإن أفضلها كان ٣% لتلافى ظاهرة التميؤ الزجاجى. وقد أشار Langford & Wainwright (1987) إلى أن خفض تركيز السكر فى بيئة النمو يزيد من معدل التضاعف للورد. أما من ناحية تأثير تركيز السكر على تكوين الأجنة الجسدية فقد أدت زيادة التركيز من ٣ إلى ٦% إلى زيادة معنوية فى عدد الأجنة المتكونة ليصبح ٦ لكل مستأصل نباتى من السويقة الجنينية العليا لنباتات *Pelargonium zonal* وبصورة عامة يؤثر السكر على الكشف فى:

١. **تكوين الحزم الوعائية:** تساهم السكريات بوضوح فى كشف عناصر الخشب واللحاء فى خلايا مزارع الأنسجة المنزرعة فوجود السكر ضرورى لتكوين قصيبات الخشب tracheid. واتضح من بعض التجارب أن عدد الأنابيب الغربالية والخشب المتكون ونسبة كل منهما إلى الآخر تتوقف على تركيز السكر. إلا أنه ليس من الواضح تماماً ما إذا كانت السكريات تقوم بدور آخر غير كونها مصدر للطاقة اللازمة لعمليات الأيض النباتى الضرورية للكشف.

جدول ٢-٩: تأثير تركيز السكر في الحفاظ على حياة المستأصلات النباتية المنزرعة وتكشف الجذور على النباتات المتكشفة من نبات *Lilium longiflorum*. بعد شهرين من الزراعة (Azadi & Khosh-Khui, 2007).

المستأصلات النباتية التي استمرت حية (%)	عدد لجذور / النبات	عدد الأيام من الزراعة	السكر (%)
٤٠	١٢.٢	٦٠	١
٩٥	٢.٥	٦٠	٢
١٠٠	٩.٨	٧٥	٣
١٠٠	١.٧	٩٠	٤



شكل ٢-٣: نمو وتجذير العقل الساقية لنباتات *F. carica* في بيئة MS تحتوي على تركيز ٣٠ و ١٥ و صفر جم/لتر من السكر (من اليمين إلى اليسار على التوالي، وذلك بعد شهرين من الزراعة).

٢. تكوين الكلوروفيل: يعتبر تركيز السكر المشجع للنمو في مزارع الأنسجة مثبتاً لتكوين الكلوروفيل لكن هذا التركيز المثبط يختلف باختلاف الأنواع النباتية، فبعض الأنواع لها القدرة على تخليق الكلوروفيل عندما يكون تركيز السكر في البيئة صفر. وقد أرجع ذلك إلى أن السكر يعمل على تثبيط الأنزيم المخلق لـ 5-aminolaevulinic acid (ALA) وهو بادئ لتكوين جزيئات Porphyrin الداخلة في تكوين الكلوروفيل. وبزيادة مدة نمو المزرعة في وجود السكر تفقد الخلايا قدرتها على تكوين الكلوروفيل

وتمتلى البلاستيدات بالنشا ويتغير محتواها من الأحماض النووية RNA و DNA، وقد تكون بعض الأشرطة النامية في مزارع الأنسجة قادرة على القيام ببعض النشاط الضوئي وعملية البناء بشرط أن يكون تركيز السكر منخفض.

٣. تراكم النشا والتكشف: يتراكم النشا غالباً في بلاستيدات خلايا الكالس وكذلك في معلق الخلايا خصوصاً في مرحلة الثبات من منحني النمو. ولما كانت عملية الكشف تحتاج إلى طاقة فإن النشا يتم تحلله في مرحلة الكشف، وينخفض تركيزه وتزيد سرعة عملية التنفس في مزارع الأشرطة عن الكالس أى أن السكر من متطلبات عملية الكشف (Thorpe *et al.*, 1986) و (Azadi & Khosh-Khui, 2007). ولوحظ تراكم النشا الذي مصدره السكر في خلايا الدخان في بعض المواقع التي تتكشف فيما بعد إلى أشرطة. وعلى هذا يُقترح أن عملية تراكم النشا من متطلبات حدوث الكشف حيث يعمل كمصدر للطاقة اللازمة لتكشف القمم الميرستيمية والأشرطة. لكن لا يتم تراكم النشا قبل الكشف في بعض الأنواع النباتية (Von Arnold, 1987)، والاكتر من ذلك قد يؤدي تراكم النشا في بعض النباتات إلى تثبيط الكشف. مثلاً لوحظ أن خلايا البرسيم الحجازي المنتخبة لتحمل الملوحة تفقد قدرتها على الكشف بعد زراعتها لمدة ثلاث سنوات في بيئة تحتوى ٣% سكر، وينقل الخلايا إلى بيئة تحتوى على ١% سكر وتركيز عالى من 2,4-D لمدة ٢٤ يوم انخفض تركيز النشا وتكشفت الأشرطة (Rains *et al.*, 1980).

هـ. المواد العضوية غير محددة التركيب

قبل استخدام الكيماويات عالية النقاوة كانت بيئات مزارع الأنسجة تتضمن بعض المركبات غير محددة التركيب والتي تمتاز بإحتوائها على عدداً من المواد المختلفة والتي يختلف تركيزها من مستحضر لآخر. ومن هذه المواد التي أثبتت فاعلية في مزارع الأنسجة لبن جوز الهند، الكازين المتحلل، مستخلص الخميرة، عصير

البرتقال. وتحتوى هذه المواد على عناصر غذائية، هرمونات، فيتامينات، أحماض عضوية وأمينية. فعلى سبيل المثال عند تحلل بروتين الكازين بالأحماض أو بالإنزيمات تتكون العديد من الوحدات الصغيرة عبارة عن خليط من الأحماض الأمينية يصل عددها إلى ١٨ حامض والسلاسل الببتيدية مختلفة الأطوال والفيتامينات التى يمكن أن تمتص بواسطة الأنسجة النباتية كمصدر للعناصر المعدنية مثل الكالسيوم والفوسفات (Thorpe et al., 2008). وأشار أيضا إلى اعتبار الكازين المتحلل مصدرا جيدا لحامض الجلوتامين عند نقصه فى البيئة بسبب عدم كفاية محتواها من الفوسفات. وقد سجل (Suezawa et al., 1988) تحسين فى معدل نمو معلق خلايا نباتات *Actinida chinensis* بإضافة ٥ مليمول من الجلوتامين. وبالطبع فإن استعمال الكازين المتحلل يكون أفضل من إضافة الأحماض الأمينية الناتجة من تحلله لاحتوائه على العديد من المركبات الأخرى كما سبق الذكر. لكن رغم ذلك يندر استخدام هذه المواد فى مزارع الأنسجة الآن لأنها غير نقية تماما ويتغير تركيبها تبعاً للمصدر وطريقة التحلل.

ثالثاً: المواد المصلبة للبيئة

يمكن أن تنمو الأنسجة النباتية فى بيئة سائلة بشرط توفير الأكسجين الضرورى للنمو وبدون الحاجة إلى سطح صلب لتدعيم النمو فى أغراض معينة. وربما تنمو الأشطاء عند استعمال طبقة رقيقة من البيئة السائلة دون الحاجة إلى تهوية. فقد أمكن الحصول على عدد هائل من أشطاء *Ruta graveolens* يصل وزنها الطازج إلى ١٠٠ جم خلال شهر من زراعة ٢ جم من الأشطاء حديثة الكشف فى ٢٠ مل من بيئة MS على أن تجدد البيئة كل أسبوع (شكل رقم ٢-٤).

لكن هناك بعض المميزات التى تتطلب وجود سطح شبه صلب لتدعيم النمو، أو استعمال الوسط الصلب والسائل معا والتى سيتم مناقشتها فى الباب الرابع من هذا الكتاب. وفى البداية حاول البعض تدعيم نمو الكالس والأفرع على ورق سلوفان، وورق

ترشيح، وأنسجة قماش، وكرات من الزجاج، ثم استخدمت مواد تعمل على تصلب البيئة فتدعم النمو دون إعاقة نمو الجذور. ولا بد أن تكون المواد المستعملة قابلة للتعقيم وأن تظل البيئة سائلة وهي ساخنة حتى يمكن صبها لتتجمد بعد التبريد. وهناك العديد من المواد التي يمكن استعمالها لهذا الغرض لكن يتوقف ذلك على العامل الاقتصادي. والهدف من الزراعة فعلى الرغم أن الأجاروز غالى الثمن جداً إلا أنه أفضل تلك المواد لزراعة البروتوبلاست ومن هذه المواد ما يلي:



شكل ٢-٤: الأسطاء المتكشفة من زراعة أوراق نباتات *Ruta Graveolens* في بيئة سائلة وبدون الحاجة لنظام تهوية أو رج.

١. الأجار Agar

وهو منتج طبيعي يتكون من خليط من الكربوهيدرات المشتمة على عديد من السكريات البسيطة ويتم استخلاصه من عدة أنواع من الطحالب الحمراء التابعة لأجناس *Gelidium* و *Gracillaria* و *Perocladia* النامية في مياه البحار، لكن يلزم تنقيته بعناية حتى لا يحتوى على مواد سامة. ويعتبر الأجار من الناحية الغذائية خاملاً لكنه قد يحتوى على بعض الآثار من العناصر المغذية، والتي تختلف نسبتها تبعاً لنوع الطحالب ومكان نموها وفترة جمعها وطريقة الاستخلاص. كما تختلف نسبة الشوائب باختلاف نوع الأجار، ويوضح جدول رقم (٢-١٠) تركيز الشوائب في بعض أنواع

الآجار شائعة الاستخدام في زراعة الأنسجة. هذا بالإضافة إلى إشارة المنتج إلى وجود بعض الشوائب الأخرى مثل الماغنسيوم، والمنجنيز، والكاديوم، والنحاس، والكروم، والحديد، والرصاص، والنيكل، والسلفات وغيرها حيث تحتوى الأنواع الرثنية على مواد فينولية وربما بعض السلاسل الطويلة للأحماض الدهنية. وقد يصل معدل بعض هذه الشوائب إلى أكثر من ٢٠% من تركيزها في بيئة MS.

ويعتبر عدم احتواء الآجار على مواد سامة مثبطة للنمو محل شك. ونظراً لارتفاع الوزن الجزيئى للآجار فإن له قدرة عالية على تصلب البيئة لارتباطه الشديد بجزيئات الماء. كما أنه يمتص بعض المركبات من مكونات البيئة والمركبات الأخرى الناتجة من عمليات الأيض النباتى. وإذا زاد تركيز الآجار عن ١٠% يكون من الصعب على النبات امتصاص المحلول المغذى من البيئة، حيث تكون قوة ارتباط الماء بالآجار أعلى من قدرة النسيج على الامتصاص. أما التركيز الأمثل فهو يضمن تدعيم الأنسجة المنزرعة والنباتات وتحرك المحلول من البيئة للنسيج أو النباتات المنزرعة.

جدول ٢-١٠: النسبة المئوية للشوائب ببعض أنواع الآجار المستعملة في زراعة الأنسجة (Pierik, 1987).

نوع الآجار			الشوائب
Bacto-Agar	Noble-Agar	Purified-Agar	
٤.٥٠	٢.٦٠	١.٧٥	رماد
٠.١٣	٠.٢٣	٠.٢٧	كالمسيوم
٠.٠١	٠.٠١	٠.٠١	باريوم
٠.١٩	٠.٢٦	٠.٩٠	سليكا
٠.٤٣	٠.١٨	٠.١٣	كلوريد
٠.٥٤	١.٩٠	١.٣٢	سلفات
٠.١٧	٠.١٠	٠.١٤	نتروجين

ومن الثابت أن الآجار يدمص بعض العناصر على سطحه لكن ليس من المؤكد حتى الآن ما إذا كان لذلك تأثير على استجابة المُستأصل النباتي أم لا (Leifert *et al.*, 1995). وغالباً يستعمل الآجار المعروف Difco Bacto agar بتركيز ٠.٦-٠.٨%، كما يكثر استعمال أنواع أخرى مثل Gibco Phytagar و Flow agar و Sigma، لكن ينصح باستعمال الآجاروز بدلاً من الآجار عند زراعة البروتوبلاست. ومن مميزات الآجار كمصلب للبيئة:

١. تتصلب البيئة المحتوية على الآجار عند أقل من ٤٥° م وتتحول إلى الحالة السائلة برفع الحرارة مرة أخرى إلى ١٠٠° م تقريباً.
٢. لا يتم تحلله بالإنزيمات المفرزة من النبات.
٣. نادراً ما يتفاعل مع باقى مكونات البيئة.

ويختلف تأثير الآجار باختلاف نوعه فقد وجدت فروق ميكروسكوبية فى كشف قصيبات الخشب لكالوس الخس باختلاف نوع الآجار، لكن لم يكن هناك فرق فى عدد القصيبات المتكشفة عند استعمال Flow agar أو Gibco Phytagar أما عند استعمال النوع KC-TC زاد عدد القصيبات المتكونة. وكان هناك نقص فى عدد القصيبات باستعمال الآجاروز FMC. وقرن (Scholten & Pierik 1998) تأثير سبعة أنواع من الآجار على الإكثار الدقيق لأحد هجن الورد *Rosa hybrida* باستعمال العقد الساقية وتوضح النتائج بجدول رقم (٢-١) الفروق المعنوية فى وزن وطول الأفرع وكذلك عدد ووزن الجذور المتكشفة. وبالرغم من أن النوع BD purified أنتج أعلى وزن من الأشطاء مقارنة مع باقى الأنواع إلا أن وزن وعدد الجذور كان أقل مقارنة مع باقى الأنواع المختبرة. كما اختلفت حساسية الأنواع لنوع الآجار باختلاف مراحل النمو والتكشف (جدول رقم ٢-١٢). ويستعمل الآجار غالباً بتركيز ٦-٨ جم/لتر حسب نوعه الآجار المستخدم، وهذا التركيز يضمن صلابة البيئة والاتصال الجيد بين

المُستأصل النباتي والبيئة. وبذلك يمكن تناول الأوعية المحتوية على هذا التركيز والمستعملة للزراعة دون ملاحظة سيولة البيئة، ووضع الأنسجة النباتية على سطحها دون أن تغوص فيها مع صمان غرسها برفق لنضمن تلامس جيد بين المُستأصل النباتي والبيئة. وعند إضافة الآجار بتركيز ١٠ جم/لتر تكون البيئة شديدة الصلابة ويصعب وضع النسيج عليها وزيادة صلابة البيئة يشبط نمو الكالس لكن قد يحفز ذلك الكشف لزيادة الجهد الاسموزي للبيئة، وربما يقلل زيادة تركيز الآجار حتى ١٢% من مشكلة التمييز الزجاجي.

وبالإضافة إلى تأثير تركيز الآجار على صلابة البيئة فإن البيئة التي تحتوي على تركيز أقل من الأملاح تكون أكثر صلابة من تلك المحتوية على تركيز أعلى (Ziv, 1991). كما يؤدي انخفاض الرقم الهيدروجيني إلى ٤.٥ لجعل البيئة أقل صلابة.

جدول ١١-٢: تأثير استعمال سبعة أنواع من الآجار على نمو الأشطاء والجذور من العقد الساقية لصنف الورد Motrea كما سجلها Scholten & Pierik (1998).

الأنسجة				نوع الآجار
العدد	الوزن (ملجم)	الوزن (ملجم)	الطول (مم)	
٦.٢	٣٥	٩٠	٤١	Merck1614
٧.١	٢٥	١٨	٦٠	Daishin (Brunschwig Chemie, Netherlands)
٧.٩	٣٠	١٣٥	٨٩	Difco Bacto
١١.٢	٣٩	١٣١	٨٢	MC29 (Lab M, UK)
٦.٩	٢٤	٩٧	٧٤	BD (Becton Dickinson) grade A
٥.٢	١٨	١٢٩	٨٤	BD granulated
١.٧	١١	٢١٣	١٢٢	BD purified

ومن الصفات الطبيعية الهامة التى تتصف بها البيئة المضاف إليها الآجار، تقليل معدل انتشار الجزيئات المختلفة حيث يعاق انتشار الجزيئات كبيرة الحجم نتيجة تصلب الآجار ويقل الجهد المائى وتزيد لزوجة البيئة. ويعتقد أن هذا يعمل على تراكم نواتج عمليات الأيض السامة فى الأنسجة المنزرعة، ويقلل تيسر مكونات البيئة المختلفة كالأيونات والهرمونات والعناصر الغذائية والمكونات الأخرى، لتناسب ذلك مع حركة الماء من البيئة إلى النسيج. علاوة على أن المستأصل النباتى فى البيئة السائلة يكون كله متصل بالبيئة أما فى حالة البيئة الصلبة فإن نصف النسيج المنزرع فقط أو أقل من النصف يكون متصلاً بالبيئة، ويتمكن الجزء العلوى فقط من النسيج المنزرع من الحصول على الأكسجين.

ومن البديهي أن الضغط الاسموزى للأنسجة المنزرعة فى بيئة صلبة أقل من تلك المنزرعة فى وسط سائل، ليتمكنها من امتصاص الماء من البيئة. ويلاحظ أن البرولين يتراكم فى الخلايا المنزرعة فى بيئة متصلبة مما يشجع التكثف فى بعض الحالات. أما من الناحية الاقتصادية فإن الآجار يعتبر من المكونات مرتفعة الثمن والتى تسبب زيادة تكاليف البيئة وبالتالي الإكثار الدقيق. ويوضح (Jain & Barbbar 2002) فى جدول رقم (٢-١٣) مقارنة بين تكاليف استعمال الآجار وبعض البدائل الأخرى، ويتبين من هذه المقارنة أهمية دراسة تأثير تلك البدائل على إكثار النباتات المختلفة خاصة فى المجال التجارى.

٢. الآجاروز Agarose

يصنع الآجاروز من الآجار، فهو عبارة عن مواد عديدة التسكر. ويندر استعماله فى مزارع الأنسجة نظراً لسعره المرتفع ويرجع ذلك إلى عملية تنقيته. لكنه يعطى قوام هلامي أكثر صلابة من الآجار ولذا يستعمل بتركيز منخفض فى حدود ٠.٤%. ومن الناحية العملية لا يستعمل فى زراعة الأنسجة إلا فى حالات قليلة كزراعة البروتوبلاست والمتوك. ويمتاز الآجاروز بتجمده عند درجات حرارة منخفضة ٣٠° م

تقريباً مما يجعله افضل لزراعة البروتوبلاست بالمقارنة مع البيئة السائلة Bolandi et al. (1999). حيث يتم وضع معلق البروتوبلاست فى طبق بترى فى شكل قطرات حجمها ٥٠ ميكروليتر ثم تصب طبقة رقيقة من البيئة فوقها، وبهذه الطريقة يمكن زراعة البروتوبلاست بكثافة منخفضة.

جدول ٢-١٢: حساسية عدة أنواع نباتية للأجارات أثناء الإكثار الدقيق (Scholten & Pierik, 1998).

النبات	المُستأصل النباتي	الاستجابة ^١ الحساسية ^٢
<i>Allium porrum</i> Strata	الساق القرصية	+abd axc
<i>Brassica oleracea</i> var. 'Sierra'	السويقة الجنينية العليا	+ad ads
<i>Gerbera jamesonii</i> 'Joyce'	الساق	-c axs
<i>Hippeastrum hybrid</i> 'Cinderella'	الساق الزهرية	+c abd
<i>Hyacinthus orientalis</i> 'Pink Pearl'	الأوراق الحشفية	+c abd
<i>Linum usitatissimum</i> 'Regina'	السويقة الجنينية العليا	+abc ads
<i>Lycopersicon esculentum</i> 'Counter'	السويقة الجنينية العليا	+ad ads
<i>Lycopersicon esculentum</i> 'Counter'	السويقة الجنينية السفلى	-bc adr
<i>Nephrolepis exaltata</i> 'Teddy Junior'	الأفرع	-c axs
<i>Petunia hybrida</i> 'Parade'	الأوراق الفلجية	-ad ads

(١) ads: أسطاء عرضية، adb: بصيلات عرضية، adr: جذور عرضية، axs: أفرع جانبية.
 (٢) +: حساس، -: غير حساس، a: الطول، b: الوزن، c: عدد الأسطاء/الجذور/البصيلات حديثة التكوين، d % للتكشف.

٣. الجل رايت Gelrite

يوجد الجل رايت تحت أسماء تجارية مختلفة مثل الفيتا جل ويعتبر من مواد التصلب عالية النقاوة وهو يتكون من مواد مختلفة عديدة السكر ويتم استخلاصه من بكتريا *Pseudomonas eleodeo* حيث تمثل تلك السكريات تركيب الكبسولة الخارجية. وتحتوى الأنواع التجارية منه على شوائب البوتاسيوم، الصوديوم، الكالسيوم، الماغنسيوم، ولكن لا يحتوى على الشوائب العضوية الموجودة فى الآجار. وعند تسخين ٠.١% من الجل رايت على درجة حرارة ٣٠-٣٥° م فى وجود أيونات البوتاسيوم أو الكالسيوم أو الماغنسيوم فإن الوسط يتصلب. ويستعمل الجل رايت بتركيز أقل من تركيز الآجار (غالباً لا يتعدى ٠.٢%)، حيث يعطى هذا التركيز قوام مشابه لتركيز ٠.٧% من الآجار. وامتصاص الجل رايت للماء أقل من الآجار لذا فإن انتشار الماء والمواد الذائبة فى البيئة أفضل علاوة على شفافية البيئة مقارنة مع الآجار مما يجعل الكشف عن التلوث الميكروبي أسهل. وتشير الشركات المنتجة إلى عدم احتواء الجل رايت على مواد سامة كالمركبات عديدة الفينول. ونظراً لرخص ثمن الجل رايت ونجاح استخدامه فى عدة أنواع من مزارع الأنسجة ولأغراض مختلفة فإنه قد يحل محل الآجار فى زراعة الأنسجة (George, 1993). وقد أدى استعمال خليط من الجل رايت إلى التغلب على ظاهرة التميؤ الزجاجى الشائعة فى زراعة أنسجة بعض الأشجار.

٤. الألجينيت Alginate

يستخلص الألجينيت من حامض Alginic وهو عبارة عن heteropolymer يخلق فى أجناس مختلفة من الطحالب البنية. وتم استخدامه بنجاح فى زراعة البروتوبلاست بدلاً عن الآجاروز حيث يتم التصلب بإضافة أيونات الكالسيوم، ويكون القوام الهلامى المتكون ثابت تحت درجة الحرارة العادية مما يتيح خلط البروتوبلاست مع البيئة. ويفضل استعمال الألجينيت عن الآجار لأن الآجار يتجمد على

جدول ٢-١٣: مقارنة تكاليف بعض المواد المصلبة للبيئة المستعملة في زراعة الأنسجة (Jain & Barbbar, 2002).

المادة المصلبة	التركيز المستعمل %	التكاليف/لتر من البيئة (US\$)
Agar (Difco-bacto)	٠.٨	٣.٨٧
Agar (bacteriological grade)	٠.٩	٠.٣٣
Agarose (Sigma)	٠.٤	٧.١٧
Alginate (Sodium salt, Sigma)	٢.٠-٠.٥	٣.٢٦ (%٢)
Carrageenan (Sigma)	١.٠	٢.٣٩
Starch (Tapioca)	١٠.٠	٠.٠٠٣
Isubgol (Maashal brand)	٣.٠	٠.١٥
Gum-Katira	٣.٠	٠.١٩
Gelrite (gellan gum)	٠.٣-٠.٤	٠.٧١ (%٠.٤)
Ficoll (Sigma)	١٠-٤٠	٣٧.٨٧ (%٤٠)

على درجة حرارة ٥٤٥ °م. ويمكن إذابة القوام الهلامي المتكون بإضافة استرات الصوديوم وبذلك يتحرر البروتوبلاست. أما عيوب استعمال الألبينيت فتتمثل في تأثيره بالتعقيم الحراري وتكسير جزء كبير منه لذا يعقم على ٩٠ °م ولمدة ٢٠ دقيقة فقط. والمشكلة الأخرى التي تعيق من استعمال الألبينيت هي تفاعله مع الكاتيونات المتأينة مما يقلل من تيسرها في البيئة.

٥. النشا

يعتبر النشا من أرخص المواد المستعملة في تصلب البيئة لكن ليس من المتوقع أن يصبح بديلاً للأجار، ويرجع ذلك إلى ضعف صلابة القوام الهلامي المتكون وكونه غير رائق مما يعيق اكتشاف تلوث المزرعة بالبكتيريا. أضيف إلى ذلك إمكانية تحلله بالإنزيمات المخلفة في الأنسجة المنزرعة، علاوة على ذلك لوحظ أن صلابة القوام الهلامي المتكون تقل بعد التحضير حتى بدون تحضير أنسجة على البيئة. ومن الناحية العملية يتم مزج النشا مع أحجام صغيرة من البيئة أي ما يعادل ١٠% تقريباً من حجمها على درجة الحرارة العادية ثم تضاف هذه الكمية إلى باقى البيئة على درجة الغليان ويتم الخلط والصب بسرعة قبل التجمد. وأثناء التعقيم يتحلل جزء من النشا إلى سكريات يكون لها بالطبع تأثير على استجابة النسيج. فقد وجد أن معدل تكوين النباتات من مثك الشعير المنزرع في بيئة تحتوى ٥% من نشا الذرة أعلى من تلك المتكونة في بيئة تحتوى على آجار. وعندما استخدم النشا بدلاً من الآجار لتصلب البيئة المستخدمة لزراعة أجزاء من درنات البطاطس تكشفت الأفرع بعد ٣ أسابيع فقط في حين حدث التكشف بعد ١٤-٥ أسبوع باستخدام الآجار.

ولما كان النشا يكون سطحاً قليل الصلابة فإنه يفضل أن يغطى بطبقة من البولي استر حتى لا يغوص الجزء المنزرع به أو يتم إضافة نسب من مواد مصلبة أخرى كالأجار، الجيل رايت أو الصمغ العربى. ويستعمل النشا عادة بتركيز ٧% أو أعلى حتى يعطى سطحاً ثابتاً وقد يصل التركيز إلى ١٢%، وقد استعمل هذا التركيز في زراعة القمم النامية لنباتات *Nephrolepis exaltata* لكنه غير مستحب. واستطاع Kodym & Zapata (2001) أن يستبدلا الجل رايت بخليط منه مع النشا ومن البدائل الأخرى الدقيق ودقيق السامولينا ونشا البطاطس ودقيق الأرز. وضح Prakash et al. (2003) في جدول رقم (٢-١٤) أن خليط من بدائل الآجار كان أفضل من الآجار في إكثار *Zingiber officinale*. كما أن استعمال خليط نشا الذرة بتركيزات منخفضة (٥٠

جم/لتر) مع الجل رايت (٠.٥ جم/لتر) فى بيئة إكثار اشجار التفاح والموز وكذلك قصب السكر أفضل من استعمال الآجار. لكن كان من الصعب اكتشاف تلوث البيئة نظراً لأن لون البيئة يميل إلى اللون الرمادى. ومن مميزات استعمال البدائل المشار إليها خفض تكاليف البيئة بنسبة عالية لكن قد تسبب هذه المكونات تثبيطاً للنمو (Powell & Uhrig, 1987).

قام (Naik & Sarkar (2001 باستعمال أحد منتجات النشا يطلق عليها Sago وهو منتج غذائى يصنع من أحد أنواع النخيل المسمى بهذا الاسم، أو من مصادر أخرى مثل نشا الأرز أو الذرة أو البطاطس ولكن هناك فروق فى درجة الشفافية لهذا المنتج حسب مصدر النشا المستعمل. وقام الباحثان باستعماله كمادة مصلبة للبيئة المستعملة لإكثار عدد من الطرز الوراثية للبطاطس أو لحفظ النباتات الناتجة عند الحد الأدنى للنمو. ولم تكن التركيزات الأقل من ٨٠ جم/لتر فعالة لإعطاء درجة التصلب المناسبة للبيئة أى التى تمنع غوص الأجزاء المنزرعة. وتشير النتائج الموضحة فى جدول رقم (١٥-٢) إلى عدم وجود فروق بين استعمال الآجار أو الساجو فى معظم الصفات فى مرحلة الإكثار مع وجود تداخل بين نوع مادة التصلب والطرز الوراثية. وكان هناك ميزة فى استعمال الساجو بالمقارنة مع الآجار فى حالة كون الهدف إبطاء النمو للحد الأدنى بسبب زيادة الضغط الاسموزى للبيئة بسبب تحلل جزء منه إلى سكر أثناء التعقيم. ولعل الميزة الواضحة من استعمال النشا والساجو هو عدم نقص درجة التصلب حتى بعد شهرين من الزراعة. كما أن تكاليف استعمال الساجو منخفضة جداً بالمقارنة بالآجار حيث يبلغ ثمن الكيلوجرام حوالى ٠.٣٥ دولار أمريكى.

ولاحظ (Mohamed & Alsadon (2010a نجاح إكثار نباتات البطاطس بالعقل الساقية باستعمال النشا التجارى للبطاطس أو الذرة بدون تأثير على ارتفاع النباتات مع زيادة عدد الأفرع عند استعمال ١ جم/لتر من الآجار و ٥٠ أو ٦٠ جم/لتر

من النشا. وقد انخفض الرقم الهيدروجيني للبيئات التي استعمل فيها النشا بتركيز ٥٠ أو ٦٠ جم/لتر من النشا. وقد انخفض الرقم الهيدروجيني للبيئات التي استعمل فيها النشا بتركيز ٥٠ أو ٦٠ جم/لتر، لزيادة قدرة النباتات على امتصاص الأيونات من البيئة نظراً لعدم تغيير مواصفاتها الطبيعية وصاحب ذلك ارتفاع في توصيلها الكهربى .

جدول ٢-١٤: تأثير بدائل الآجار على تصلب البيئات المستعملة فى زراعة أنسجة *Zingiber officinale* كما وجدها (Naik & Sarkar (2001).

المكون	جودة التصلب والنمو بالمقارنة مع الآجار
٨% دقيق القمح	تصلب فقير للبيئة، وضعف النمو
١٠% دقيق القمح	تصلب مناسب، لكن النمو اقل من المعدل
٦% نشا	تصلب مناسب ونمو مشابه للنمو العادى
٧% سامولينا	تصلب مناسب ونمو مشابه للنمو العادى
٧% دقيق البطاطس	تصلب مناسب ونمو مشابه للنمو العادى
١١% دقيق الارز	تصلب مناسب، لكن النمو ضعيف
٧% ساجو	تصلب مناسب ونمو مشابه للنمو العادى
نشا + دقيق البطاطس + سامولينا ٢:١:٢	التصلب والنمو مشابه للبيئة المحتوية على الآجار

٦. الصمغ

وهو من المركبات الطبيعية عديدة التسكر التى تخلق فى الكثير من الأنواع النباتية. ويمتاز الصمغ عموماً بقدرته على زيادة لزوجة الماء حتى عند استعماله بتركيزات منخفضة نسبياً، حيث يتشرب بالماء وينتفخ مكوناً قواماً اسفنجياً شفافاً. ويستخلص الصمغ من بعض النباتات كأشجار الصمغ العربى

والعشبيات مثل *Cyamopsis tetragonolobus* وهو من المصادر الطبيعية لصمغ Galactomannans والذي يتركب من المانوز و الجلاكتوز بنسبة ١.٦-١. ويعتبر الجلاكتوماننانز ثانى أكبر مجموعة سكريات متعددة تستخدم فى تخزين السكريات فى النباتات. ويشجع السعر الرخيص لهذا المنتج وقدرته على تصلب البيئة على استعماله كبديل للأجار. وقد استعمل Lucyszyn et al. (2006) خليط من الجلاكتوماننز المستخلص من نباتات *Cassia fastuosa* و *tetragonolobus* والأجار بمعدل ٣ و ٠.٣% على التوالى لإكثار نباتات الفراولة. وظهرت دراسة الخواص الطبيعية للبيئة تأثير جيد للخليط، كذلك كان نمو الأشطاء والجذور أفضل بالمقارنة مع استعمال الأجار بمفرده.

ومن أنواع الصمغ التى استعملت لتصلب البيئات فى مزارع الأنسجة صمغ الكاترا Katira Gum وهو مادة عديدة التسكر غير ذائبة تحتوى على ٥٠% بنتوز وجلاكتوز تفرز من لحاء أشجار *Cochlospermum religiosum* وهو شبيه بالصمغ العربى المفرز من أشجار *Acacia arabica* وله عدة استعمالات صناعية ودوائية. وبالتحلل المائى فى وجود أيونات المعادن ينتج ١٤% حامض الخليك وحامض الجوندك والزيلوز والجلاكتوز و α-cochlospermic. وتم استخدام صمغ الكاترا بنجاح للحصول على بيئة شبه صلبة صالحة لتكوين الأشطاء والجذور والأجنة الجسدية ويوضح جدول رقم (٢-١٦) مقارنة بين استعمال صمغ الكاترا والأجار على تكوين الكالس والجذور فى نباتات *Syzgium cuminii* وتكوين الأجنة الجسدية فى نباتات *Albizia lebeck* كما أوضحها Jain & Barbbar (2002). حيث يتضح من النتائج عدم وجود فروق بين كلا المادتين.

جدول ١٥-٢: تأثير الأجار والساجو على الإكثار الدقيق لبعض الطرز الوراثية من نباتات البطاطس (Naik & Sarkar, 2001).

الطرز الوراثي	الوزن الجاف	عدد الأوراق/نبات	عدد العقد/نبات	ارتفاع الأفرع (مم)				
					الآجار	الساجو	الآجار	الساجو
CP-2270	٨٠.٧	٨١.٤	٩.٥	٨.٩	٩.٥	٨.٠	٨٢.١	٨٦.٤٠
CPU-199	١٠٨.٧	٩٤.٠٢	٧.٥	٧.٦	٧.٦	٧.٠	٥٦.٩	٤٥.٦
Huachapa	١٢٢.١	١٧٧.٨	٨.٧	٩.٣	٧.٩	٨.٤	٧٥.١	٨٢.٢
I-1035	١٠٢.١	١٦٢.٢	٨.٦	١٠.٦	٦.٩	٨.٩	٣١.١	٦٩.٠
Imilla Blanca	١٩٣.٤	١٤٤.٤	١٢.٠	١٠.٤	١٠.٩	٩.٧	١١٩.٤	٩٤.٨
Kufri Badshah	٩٣.٥٠	١١٨.٩	٩.٠	١٠.٨	٨.٥	١٠.٠	٨٣.٢	٩٩.٣
K. Jyoti	٩٣.٦	٨٧.٦	٩.٠	١١.٢	٨.٠	١٠.٢	٦٦.١	٩٦.٦
K. Lalima	٨٨.٣٥	٨٨.٩٣	٧.٦	٧.٦	٧.١	٧.٣	٢.٤٦	٦٦.٤
K. Neela	٩٥.١٧	٨٦.١٧	٨.٢	٨.٦	٧.٠	٨.٣	٧٥.٧	٧٥.٥
K. Sindhuri	٩١.٢٨	٩٦.٦٢	٧.٠	٧.٧	٦.٣	٦.٨	٧٠.٩	٧٤.٧
LSD 5%	٤٢.٥١	٢.١	١.٩	١٨.٣				

وتم أيضاً الحصول على القوام الصلب للبيئة باستعمال خليط من الصمغ بنسبة

تتراوح بين ١ و ٣% مع الأجار بنسبة ٠.٢-٠.٦% وتوضح نتائج Jain & Barbbar

(2002) في جدول رقم (١٧-٢) أثر هذا الخليط على لزوجة البيئة وتكوين الأشطاء

والجذور في *S. cuminii* وأشجار *Albizzia lebeck* بجدول رقم (١٨-٢). وكانت

لزوجة البيئة المحتوية على تركيز ٣% من الصمغ تعادل ١٨% من تلك المحتوية على ٠.٩% آجار ويعنى ذلك أن حركة الأوعية المحتوية على البيئة ستؤدى إلى غمر الأجزاء النباتية مما يقلل التهوية ويزيد من مشكلة التميؤ الزجاجى. وبالرغم من ذلك كانت هناك استجابة موجبة فى نمو هذه الأجزاء مما يعنى توفر التهوية بطريقة غير معروفة. أما زيادة التركيز عن ٣% فقد أدت إلى تكوين وسط شديد التماسك يصعب معه صب البيئة.

جدول ١٦-٢: مقارنة الآجار بصمغ الكاترا كمصلب للبيئة المستعملة لزراعة أنسجة نباتات *Syzgium cuminii* و *Albizia lebeck* كما أوضحها Jain & Barbbar (2002).

المادة المصلبة		الصفة
صمغ الكاتيرا	الآجار	
تكوين الكالس فى <i>S. cuminii</i>		
٤٠	٤٠	عدد الأجزاء النباتية
٨٠	٧٥	للأجزاء المستجيبة %
٣	٢.٥	عدد الأشطاء/للجزء النباتى المستجيب
١.٢	١.٠	متوسط طول الأشطاء (سم)
تكوين الجذور فى <i>S. cuminii</i>		
٢٤	٢٢	عدد الأجزاء النباتية
٩١	٩٠	للأجزاء المستجيبة %
٢.٤	٢.٥	متوسط طول الجذر (سم)
تكوين الأجنة الجسدية فى <i>A. lebeck</i>		
٣٠	٢٨	عدد الأجزاء النباتية
٨٠.٠	٧٥	الأجزاء المستجيبة %
٤.٢	٣.٩	عدد الأجنة/للجزء النباتى المستجيب

جدول ١٧-٢: تأثير خلط الآجار (A) وصمغ الكاترا (G) على لزوجة البيئة واستجابة الأنسجة المنزرعة لنبات *Syzygium cuminii* كما أوضحها Jain & Barbbar (2002).

المادة المصلبة %	اللزوجة (Pa S)	عدد المُستأصلات لمستجيبة (%)	المُستأصلات طول الأشطاء (سم)	عدد الأشطاء/ للمستأصلات
1G+0.2A	٢.٠٣٧	٤٠	٠.٠	٠.٠
1G+0.4A	٥.٩٣٦	٤٠	٤٠.٥	٠.٠
1G+0.6A	٥.٤٥٩	٤٠	٥٢.٦	٠.٧
2G+0.2A	٦.٦٧٧	٤٢	٠.٠	٠.٠
2G+0.4A	٦.٢٨٢	٤٢	٦١.٩	٢.٥
2G+0.6A	٨.٣٥٠	٤٢	٥٩.٥	٣.٤
3G+0.2A	١.٩٢١	٤٢	٤٥.٢	٠.٠
3G+0.4A	٤.٨٢٦	٤٠	٦٠.٦	٢.٥
3G+0.6A	٤.٧٨٠	٤٠	٦٧.٥	٣.٨
3G	٦.٠٥٨	٤٢	٦٥.٥	٤.٠
0.9A	٣٩.١٧	٤٦	٦٩.٦	٤.٢

جدول ٢-١٨: تأثير خلط الآجار (A) و صمغ الكاتيرا (G) على لزوجة البيئة وتكوين الأجنة الجسدية في نبات *Albizia lebeck* كما أوضحها Jain & Barbbar (2002).

الأجزاء المستجيبة %	عدد الأجنة/ جزء نباتى مستجيب	عدد الأجزاء النباتية	اللزوجة (Pa S)	المادة المصلبة %
٠.٠	٠.٠	٤٠	٢.٠٣٧	1G+0.2A
٠.٠	٠.٠	٤٦	٥.٩٣٦	1G+0.4A
٠.٠	٠.٠	٤٦	٥.٤٥٩	1G+0.6A
٠.٠	٠.٠	٤٢	٦.٦٧٧	2G+0.2A
٥٢.٢	٠.٠	٤٠	٦.٢٨٢	2G+0.4A
٨٤.١	٣.١	٤٤	٨.٣٥٠	2G+0.6A
٠.٣	٠.٠	٤٨	١.٩٢١	3G+0.2A
٧٨.٧	٢.١	٤٦	٤.٩٢٦	3G+0.4A
٨٦.٤	٣.٣	٤٤	٤.٧٨٠	3G+0.6A
٧٢.٧	٣.١	٤٤	٦.٠٥٨	3G
٩٣.٢	٣.٥	٤٤	٣٩.١٧	0.9A

(A) الآجار، (G) صمغ الكاتيرا

وعند خفض تركيز الصمغ إلى أقل من ٣% مع إضافة الآجار بتركيز ٠.٢-٠.٦% لم تستجب الأجزاء المنزرعة وخاصة *Albizia lebeck* حيث لم تتكون أى أجنة جسدية ويرجع ذلك إلى عدم صلابة البيئة بدرجة كافية لتدعيم الأجزاء المنزرعة وتوفير التهوية لها، ولم يختلف تركيز ٣% من الصمغ عن ٠.٩% آجار. بالإضافة إلى ذلك لم تلاحظ زيادة فى سيولة البيئة خلال مدة التجربة والتي استمرت شهرين مما يؤكد عدم حدوث تحلل للصمغ.

٧. الفيرمكيوليت Vermiculite

ليس من الشائع حتى الآن استخدام الفيرمكيوليت وهو عبارة عن سيليكات مائية كبديل للآجار حيث تتحرر بعض الأيونات كالبوتاسيوم عند تعقيمه. لكن قام Al- (2008) Qahtani & Alkhateeb بدراسة نمو الأجنة الجسدية لأحد أصناف النخيل باستعمال بيئة تحتوى على الآجار والفيرمكيوليت والبيتموس والبيرليت. وقد أشار إلى إمكانية نمو تلك الأجنة فى البيئات المختلفة إلا أن أفضل نمو كان عند استخدام الفيرمكيوليت ثم الآجار، أما إنبات الأجنة فكان أفضل فى بيئة الفيرمكيوليت. وكان الإنبات ضعيف جداً عند استعمال البيرليت أو البيتموس.

قام Afreen-Zobayed *et al.* (2000) باستعمال خليط مكون من نسب مختلفة من الفيرمكيوليت ومخلفات مصانع الورق من paper pulp لتنمية نبيتات البطاطا *Ipomoea batatas* الناتجة من الإكثار الدقيق فى المعمل ومقارنة ذلك بالبيئة المستعمل فيها الآجار. وأشارت الدراسة إلى أن استعمال خليط مكون من ٧٠% من الفيرمكيوليت مع لب الورق كان أفضل من استعمال الآجار أو أى من النسب الأخرى من خليط الفيرمكيوليت مع لب الورق، حيث يتضح من جدول رقم (٢-١٩) أن الوزن الطازج للأفرع والجذور كان أعلى بمعدل ٢.٧% بالمقارنة من النبيتات النامية فى بيئة مصلبة بالآجار.

كما كانت قياسات النمو للأجزاء الخضرية متمثلة فى ارتفاع الساق وعدد الأوراق أفضل بوجه عام. أضف إلى ذلك أن معدل البناء الضوئى لتلك النباتات كان أعلى من نباتات المقارنة، فبعد ثلاثة أسابيع من الزراعة كان معدل استهلاك ثانى أكسيد الكربون ١٥.٣ مليمول/ساعة مقابل ٩.٨ فقط للنباتات النامية فى بيئة الآجار. يشير ذلك إلى أن النباتات أصبحت ذاتية التغذية بدرجة أكبر، وبالتالي يتوقع سهولة أقلمتها. وتجدر الإشارة إلى أن النباتات النامية فى بيئة من الفيرمكيوليت فقط كانت غير

جيد النمو بالمقارنة مع الخليط المكون من ٧٠% فيرمكيوليت و ٣٠% لب الورق. لكن لم يكن هناك فرق معنوي في قابلية النباتات للأقلمة حيث تراوحت النسبة بين ٩٠-١٠٠% للنباتات الناتجة من بيئة محتوية على أى نسبة من الفيرمكيوليت ولب الورق. أما النباتات الناتجة من بيئة متصلبة بالآجار فكانت نسبة نجاح أقلمتها ٧٣% فقط. وامتد تأثير بيئة النمو إلى النباتات بعد الأقلمة حيث كانت النباتات التى نمت فى بيئة محتوية على الفيرمكيوليت ولب الورق أطول سوقاً وذات عدد أكبر من الأوراق. وتجب الإشارة إلى تحرر بعض البوتاسيوم من الفيرمكيوليت أثناء التعقيم الحرارى.

٨. الكاراجينين والجيلاتين K-carrageena and Gelatin

يحتاج K-carrageenan إلى وجود بعض الكاتيونات لتصلبه كما هو الحال فى Gelrite ويستعمل بتركيز ٠.٦% ليعطى صلابة تعادل ٠.٢% من Gelrite أو ٠.٨% آجار. حاول البعض استخدام الجيلاتين بتركيز ١٠% لكنه لا يستخدم كثيراً حيث ينصهر عند درجة حرارة ٣٠-٣٥°م كما يعتبر وسط مثالى لنمو الميكروبات. وهناك العديد من المركبات التى تم استخدامها كبدايل أخرى للآجار كالصوف الزجاجي أو الصخرى، كرات صغيرة من الزجاج، ورق الترشيح فوق البيئة السائلة، استعمال قطع من الإسفنج تحت ورقة الترشيح. كما يمكن تحميل المُستأصل النباتي على مادة ذات ثقب ومنها بعض الأغشية المصنعة من البولي بروبيلين مثل Celgard 3500, Questar Corp., Charlotte, N.C. واعطت نمو جيد بالمقارنة مع البيئات السائلة الثابتة أو الآجار ويميز هذه المواد إمكانية استعمالها أكثر من مرة كما يمكن تغيير البيئة وإعادة تقسيم المزرعة دون الحاجة إلى تغيير الوعاء المستعمل أثناء الزراعة، سهوله نقل النباتات للتربة، استعمال قدر قليل من البيئة (Thorpe et al., 2008).

جدول ٢-١٩: مقارنة تأثير الأجار وخليط الفيرمكيوليت مع لب الورق على نمو نبيتات البطاطا *Ipomea potatas* فى مزارع (Afreen-Zobayed *et al.*, 2000). الأنسجة

المادة المصلبة	وزن الجزور (ملجم)	وزن السوق (ملجم)	الأوراق	الأوراق	الأوراق	الأوراق	الأوراق	الأوراق
Agar	١٨.٤	٢٧٢	٦.٨	٨٠	٤٠	٥٢٣	٢٠.٩	٤.٥
*V:P (100:0)	٣١	٣٨٧	٨.٠	١١٣	٦١	٦٧١	٢٨.٦	٤.٣
V:P (90:10)	٦١	٦٧٣	٩.٩	١٢٦	٨٣	٩٨٣	٣٢.٦	٤.٨
V:P (83:17)	٦٨	٧٣٠	١٢.٤	١٧٣	٩٦	١٢٢٥	٤٠.٠	٤.٥
V:P (70:30)	٧٠	٧٣٢	١٧.٣	٢١٤	١١١	١٤٣٣	٤١.٧	٤.٨
V:P (50:50)	٦١	٦٨١	١٣.٤	١٧٤	٩١	١١٢٧	٣٦.١	٤.٨
V:P (30:70)	٦٢	٧٠٠	١٢.٦	١٧٢	١٠١	١١٦٨	٣٨.٠	٥.٤
V:P (10:90)	٤٥	٥٦١	١٢.١	١٦٧	٩٠	١١٣٠	٣٧.٠	٤.٤

* الفيرمكيوليت (V) و لب الورق (P)

رابعاً: الماء

يحتوى ماء الصنبور على كثير من الأملاح والمواد العضوية التى تختلف كما ونوعاً من مكان إلى آخر. ولما كان الماء يمثل أكثر من ٩٥% من البيئة المستعملة فإنه من الضروري استعمال ماء ذو نقاوة عالية بقدر الإمكان. ويتم تنقية الماء معملياً إما بالتقطير أو بالتبادل الأيوني. ويزيل التبادل الأيوني محتوى الأيونات المعدنية للماء، لكن تتحرر بعض المركبات العضوية من جهاز الاستخلاص. لذا يفضل وضع مرشح

بعد جهاز الاستخلاص لمنع مرور هذه الجزيئات. أما التقطير فإنه يزيل الجزيئات العضوية الكبيرة لكن بعض الأيونات المعدنية والمواد المتطايرة مثل الأمونيا والكلور تتحرر مع البخار. وقد تتطاير بعض هذه المواد من الماء المتكثف أثناء التكثيف بشرط ألا يكون ماء المكثف بارداً جداً. وعند بدء عملية التقطير يفضل استبعاد أول كمية من الماء لمدة ١٥-٢٠ دقيقة لأنها قد تحتوي على بعض المواد الطيارة التي يتم تطايرها قبل غليان الماء. وحتى لا يتم تراكم بعض المواد في المسخن والتي قد تتكسر بالحرارة يجب تنظيف المسخن من مرة إلى أخرى تنظيفاً جيداً باستعمال حمض الهيدروكلوريك المخفف ثم شطفه بماء مقطر. وفي حالة الماء العسر يفضل تنقية الماء بالتبادل الأيوني قبل التقطير لتجنب ترسيب الأملاح الزائدة في جهاز التقطير. ويفضل دمج الطريقتين أي التقطير والتبادل الأيوني معاً للحصول على ماء عالي النقاوة.

وتستخدم معظم معامل زراعة الأنسجة ماء منقى بالتبادل الأيوني ثم يعطر أو ماء مقطر مرتين، وعلى العموم يفضل استعمال الماء المقطر مرتين في تجارب مزارع الأنسجة. ويجب عدم تخزين الماء لمدة طويلة عقب تقطيره، وفي حالة التخزين يفضل أن تكون الأوعية المستعملة من البولي إيثيلين أو زجاج البيركس لأن الأنواع غير الجيدة من الزجاج يتحرر منها مواد مثل الرصاص والصوديوم. وبالطبع تمثل عملية تقطير الماء نسبة عالية من تكاليف البيئة ومن ثم تلجأ بعض المعامل التجارية إلى استعمال ماء الصنبور إذا كان خالياً من العناصر الثقيلة والملوثات فقد أشار Ahloowalia & Prakash (2004) إلى نجاح بعض الباحثين في استعمال ماء الصنبور في إكثار الموز و *Zingiber officinale*. ويمكن استعمال الماء المعبأ المخصص للشرب وكذلك الماء المتجمع من سقوط الأمطار (Prakash et al., 2004).

خامساً: تركيز أيونات الهيدروجين (الرقم الهيدروجيني pH)

يتضح من استعراض العناصر الغذائية المكونة للبيئة أن امتصاص الأيونات المختلفة يتوقف بدرجة أساسية على الرقم الهيدروجيني للبيئة. أو بمعنى آخر تركيز أيونات الهيدروجين في الوسط، ومن المعروف أن مقياس الرقم الهيدروجيني يبدأ من ١ إلى ١٤ ونقطة التعادل هي ٧ وبانخفاضها تزيد الحموضة وزيادتها عن ٧ تزيد القلوية. والماء المقطر الخالي من الغازات مثل ثاني أكسيد الكربون يكون متعادلاً. ويتراوح الرقم الهيدروجيني لسيتوبلازم الخلايا بين ٦.٧ - ٧.٧ أما الفجوات العصارية فرقمها الهيدروجيني ٤-٦ وأثناء عمليات الأيض تتكون مركبات حمضية يجب معادلتها. وأهم طرق معادلة هذه المركبات هو مصاحبتها لأيون الهيدروجين أو البوتاسيوم حتى يتم ضخها خارج الخلايا ومعادلتها بالهيدروكسيل، ومن الجدير بالذكر أن للرقم الهيدروجيني تأثير مشابه لبعض منظمات النمو حيث يؤدي تغيير الرقم الهيدروجيني الخلوي وكمية أيونات الكالسيوم في المستأصل النباتي إلى تغيير الرقم الهيدروجيني للسيتوبلازم وذلك بطريقة تشابه تأثير الأوكسين والذي تفسر إحدى آليات عمله في تحرير أيون الهيدروجين من جدر الخلايا (Felle, 2001).

وعلى العموم فإن النباتات في مزارع الأنسجة تكون غير حساسة بدرجة عالية لتغيير الرقم الهيدروجيني في مدى يتراوح بين ٤.٥ و ٧، وإذا انخفض الرقم الهيدروجيني عن هذه القيمة أو زاد عنها فإن نمو الأنسجة يقف غالباً. فالإنخفاض الشديد في الرقم الهيدروجيني يعمل على تحول الفوسفات العضوي إلى غير عضوي ويقل تخليق المركبات الناقلة للطاقة وبالتالي ينخفض معدل النمو (Mimura et al., 2000). وعند الحديث عن الرقم الهيدروجيني للبيئة يؤخذ بعين الاعتبار ثلاث نقاط وهي تأثيره على مكونات البيئة، وتأثيره المباشر على الخلايا النباتية، وكذلك تأثيره

على التفاعل بين الخلايا والبيئة. والرقم الهيدروجيني المناسب للبيئة لا بد أن يفي بالشروط التالية.

- لا يعيق الوظائف الحيوية للأغشية الخلوية والسيتوبلازم.
- ضمان عدم ترسيب الأملاح في الوسط المغذى.
- لا يؤثر على امتصاص مكونات البيئة والهرمونات.
- لا يؤثر على تصلب البيئة.

تأثير الرقم الهيدروجيني للبيئة على امتصاص مكوناتها

ربما ينحصر تأثير الرقم الهيدروجيني على مزارع الأنسجة على امتصاص وثبات مكونات البيئة المختلفة وليس على الخلية نفسها بطريقة مباشرة (Mimura *et al.*, 2000). وبصورة عامة يزيد امتصاص الأيونات سالبة الشحنة في الوسط الحامض بينما يزداد امتصاص الكاتيونات في الوسط القلوي. وبالطبع يؤدي امتصاص الأيونات إلى تغير الرقم الهيدروجيني للبيئة كما ذكر عند مناقشة امتصاص الأمونيا والنترات. وبذلك يؤثر الرقم الهيدروجيني للبيئة على تيسر وامتصاص بعض العناصر والأيونات غير العضوية، فامتصاص الفوسفات مثلاً يكون سريعاً في الوسط الحامض ويقل بزيادة الرقم الهيدروجيني، وعندما يصل الرقم الهيدروجيني للبيئة إلى 6.2 يتحد الحديد إن لم يكن موجوداً في صورة مذبذبة مع الفوسفات ليكون فوسفات الحديدوز غير الذائبة. كذلك يتأثر امتصاص الأيونات العضوية بالرقم الهيدروجيني للبيئة فيزيد امتصاص معلق خلايا الدخان لحامض الليسين بانخفاض الرقم الهيدروجيني للبيئة، كما يتأثر امتصاص منظمات النمو مثل NAA و IAA و 2,4-D و ABA. ويزيد تأثير الرقم الهيدروجيني على امتصاص مكونات البيئة بزيادة الفرق بين الرقم الهيدروجيني للبيئة وسيتوبلازم الخلايا.

اختيار وضبط الرقم الهيدروجيني للبيئة

على العكس من النباتات النامية في تربة طبيعية حيث تنمو الجذور جيداً في تربة ذات رقم هيدروجيني 6.0-7.3 فإن معظم الخلايا في مزارع الأنسجة تتحمل الرقم الهيدروجيني 4.5-7.2 وتموت عند الرقم الهيدروجيني الأقل من 2.5-3.0 أو أعلى من 8.0. ويوضح جدول رقم (2-20) تأثير تباين الرقم الهيدروجيني عند تحضير البيئة على نمر نبيتات البطاطس عقب زراعة العقد الساقية. وعلى العكس من ذلك وضح (Bhatia & Ashwatha, 2005) أن تكشف ونمو الأشطاء من الأوراق الفلقية للبطاطم لم يتأثر بصورة كبيرة باستعمال بيئة ذات رقم هيدروجيني يتراوح بين 4.5 و 7.5 ، وربما يشير ذلك إلى اختلاف استجابة النوع النباتي. وفي معظم الحالات يتم ضبط الرقم الهيدروجيني عند تجهيز البيئة على 5-6 ويفضل أن يكون لمزارع النباتات الخشبية 5.2 أما العشبيات فيفضل أن يكون 5.8. ومن الواضح أن هذه القيم أقل من المتبع في المزارع المائية حيث تتراوح بين 6.0 و 7.3. وهناك تباين بسيط في الرقم الهيدروجيني للبيئات المختلفة اعتماداً على نوع النبات والنسيج المنزرع. ويعتقد (Sarma et al., 1990) أن طريقة إضافة الآجار إلى البيئة تلعب دوراً في التغير الحادث في الرقم الهيدروجيني فعند إضافة الآجار إلى بيئات MS و B-5 و N6 ثم تعقيم البيئة فإن الرقم الهيدروجيني ينخفض. وكان الانخفاض أقل عند خلط الآجار في الماء المقطر ثم إضافته للبيئة قبل التعقيم وكان الانخفاض في كلا الحالتين تدريجياً مع الزمن، وأصبحت البيئة أكثر حموضة عندما زرع عليها كالوس نباتات *Panax ginseng*.

وعادة يتم استخدام هيدروكسيد الصوديوم أو البوتاسيوم لرفع الرقم الهيدروجيني إذا كانت حمضية حيث يتحد OH^- مع H^+ البيئة ليكون ماء وبذلك يرتفع الرقم الهيدروجيني للبيئة. وإذا كان الرقم الهيدروجيني مرتفعاً فيضاف HCl الذي يتأين في الوسط ويتحد H^+ مع OH^- البيئة ليكون ماء وينخفض الرقم

الهيدروجيني. وحيث أن الوزن الجزيئي لهيدروكسيد الصوديوم هو ٤٠ فيضاف ٤ جم منها إلى ١٠٠ مل ماء ليعطى محلول تركيزه ١ مليمول. أما الوزن الجزيئي لحمض الهيدروكلوريك ٣٦.٥ لكنه يباع في صورة محلول تركيزه ٣٨% ومن ثم فإن ٩.٦ مل منه تضاف إلى ١٠٠ مل ماء لتعطى ١ مليمول.

جدول ٢-٢٠: تأثير الرقم الهيدروجيني على نمو نباتات البطاطس المنزرعة بالعقد الساقية (Sanavy & Moeini, 2003).

الرقم الهيدروجيني	طول النبات (سم)	عدد العقد الساقية	عدد الجذور	طول الجذور (سم)
٤.٥	٤.٨٤	٤.٦	٣.٨	٧.٣٨
٥.٠	٦.٥٢	٥.٤	٧.٢	١١.٠٠
٥.٥	٧.٨٢	٨.٦	١٠.٤	١٣.٦٨
٦.٠	٦.٨٠	٧.٢	٤.٢	١١.٩٢
٦.٥	٥.٦٢	٦.٢	٦.٢	١٠.٣٦

للخلايا النباتية القدرة على التحكم في ثبات الرقم الهيدروجيني للسيتوبلازم ويكون لتغيير الرقم الهيدروجيني في البيئة تأثير مؤقت على سيتوبلازم الخلايا حيث تعمل الخلايا على إعادة الرقم الهيدروجيني إلى وضعه الطبيعي (Parton et al., 1997). وتعمل بعض المركبات في البيئة كأملح النترات والأمونيا وكذلك المواد المصلبة كالأجار والجل رايت على ثبات نسبي للرقم الهيدروجيني. حيث يؤدي امتصاص الأيونات المشار إليها إلى تغير الرقم الهيدروجيني، ويتوقف ذلك على المكونات الأخرى للبيئة وطريقة التعقيم والنبات المنزرع. ومن الطبيعي أن ينخفض الرقم الهيدروجيني في البيئة المحتوية على NH_4^+ و NO_3^- بعد ضبطه على ٥.٨ عند

إعداد البيئة. لكن يعود الرقم الهيدروجيني للارتفاع مرة أخرى حتى يصل إلى درجة قريبة من أو أعلى من تلك الابتدائية (Prknov (2007 و Lucyszyn *et al.* (2006).

وقد أشار (Ramage & Williams (2002 إلى انخفاض في الرقم الهيدروجيني وعدم تكشف أشطاء عند زراعة الأقراص الورقية لنبات الدخان في بيئة تحتوى على الأمونيا فقط كمصدر للنيتروجين بينما لم يسجل ذلك الانخفاض وتكشفت الأشطاء عند إضافة النترات مع الأمونيا. وقد سبق تفصيل تأثير النترات والأمونيا على ثبات الرقم الهيدروجيني للبيئة عند الحديث عن النيتروجين كأحد مكونات البيئة.

وربما تضاف بعض الأحماض العضوية للبيئة للعمل على ثبات الرقم الهيدروجيني عند ٥.٥ تقريباً. لكن في بعض المزارع المتخصصة كمزارع البروتوبلاست وزراعة المعلق الخلوي بكثافة منخفضة يتطلب الأمر استعمال بعض المركبات المتخصصة مثل Tris(hydroxymethyl)aminomethane و TRIS, MES, وغيرها لثبات الرقم الهيدروجيني. وقد سجل (Klein & Manos (1960 زيادة في نشاط نمو لخلايا الدخان عند إضافة MES بتركيز ٠.٥ ميكرومول. وهناك العديد من الدراسات التي تبين التأثير الإيجابي لـ MES على تنظيم الرقم الهيدروجيني ونمو مزارع أنسجة العديد من الأنواع النباتية. وعموماً لا يعتبر MES ساماً للخلايا النباتية على الرغم من إشارة (De Klerk *et al.* (2008 إلى انخفاض معدل تكوين الجذور على سيقان التفاح بزيادة تركيز MES ولم يكن هناك تأثير مفهوم لذلك التثبيت الذي لوحظ في الأيام الأولى من الزراعة أثناء نشوء القمم الميرستيمية واختفى فعله أثناء طور النمو. وقد لاحظ (Woodward *et al.* (2006 زيادة عد الأشطاء المتكشفة في مزرعة لأشجار *Eucalyptus marginata* عند إضافة MES للبيئة وكان أفضل معدل لتكوين الجذور عند تركيز ٧.٥ ملليمول من النيتروجين بنسبة ٢:١ نترات إلى أمونيا وإضافة ١٠ ملليمول من MES لتنظيم الرقم الهيدروجيني. ولم يكن للتركيز الأقل

من MES القدرة على تنظيم الرقم الهيدروجيني خلال أربعة أسابيع من الزراعة عند استعمال النترات كمصدر وحيد للنيتروجين. كذلك يقلل وجود الفحم المنشط من انخفاض الرقم الهيدروجيني أثناء الزراعة حيث كان في مدى ٥.٤ - ٦.١ خلال ثلاث أسابيع من زراعة أنسجة نباتات *Lagerstroemia indica* في بيئة MS، أما في حالة عدم وجود الفحم المنشط فقد انخفضت القيمة إلى ٣.١ - ٤.٧ خلال نفس المدة. ولم يكن لـ BA تأثيراً معنوياً على الرقم الهيدروجيني في هذه الحالة، لكن كان للتداخل بين الفحم المنشط والتعقيم تأثيراً معنوياً في انخفاض الرقم الهيدروجيني للبيئة وارتبط تأثير كل منهما بوجود الآخر كما هو مبين في جدول رقم (٢-٢١) كما أوضحه Eymar et al. (2000).

جدول ٢-٢١: تأثير الفحم المنشط، BA والتعقيم على الرقم الهيدروجيني ودرجة التوصيل الكهربى لبيئة MS المستعملة لزراعة أنسجة نبات *Lagerstroemia indica* كما أوضحه Eymar et al. (2000).

العامل	درجة التوصيل الكهربى dsm^{-1}	الرقم الهيدروجيني
الفحم المنشط موجود -	١.٦٣	٥.٩٠
غير موجود	١.٥٢	٥.٢١
BA ٥ ملجم/لتر	١.٥٧	٥.٥٤
غير موجود	١.٥٨	٥.٥٧
التعقيم قبل	١.٥٢	٥.٧٤
بعد	١.٦٣	٥.٣٨
المتوسط	١.٥٧	٥.٥٥

تأثير التعقيم والحفظ على الرقم الهيدروجيني

يحدث تغير بسيط جداً في الرقم الهيدروجيني للبيئة يتراوح بين ٠.٣-٠.٥ أثناء التعقيم إذا كانت البيئة خالية من السكر وتركيز الفوسفات بها منخفض. ويكون الانخفاض اقل نسبياً إذا كانت البيئة محتوية على السكر أما البيئة المحتوية على المالتوز، أو الجلوكوز، أو الفركتوز فيكون الانخفاض فيها أكثر. ويتوقف مدى الانخفاض على الرقم الهيدروجيني عند التحضير حيث ينخفض إلى ٤.٢ و ٥.١ و ٨.١ بعد ضبطه عند تحضير البيئة على ٥.٠ و ٦.٤ و ٨.٥ على التوالي. وعند تعقيم البيئة السائلة المحتوية على السكر ينخفض الرقم الهيدروجيني إلى ٥.٧١-٧.٥٠ كما يؤدي الآجار المضاف إلى البيئة إلى انخفاض بسيط في الرقم الهيدروجيني ليتراوح بين ٤-٤.٦ إذا كانت البيئة مجهزة على نفس الرقم الهيدروجيني، ويتوقف مدى الانخفاض على تركيز الآجار. وذلك لحدوث تحلل مائي لبعض المركبات العضوية في البيئة أثناء التعقيم في وسط حامضي، وقد يعزى التحلل المائي الحادث في البيئة إلى نوع الآجار المستخدم.

ونلاحظ أن الآجار لا يتصلب عند انخفاض الرقم الهيدروجيني للمزرعة إلى ٥.٤-٤.٥ كذلك فإن جزء من السكر المضاف يتحلل مائياً عند الرقم الهيدروجيني ٥.٥ ويزيد التحلل بارتفاع درجة الحرارة. ويرجع أغلب التغير في الرقم الهيدروجيني إلى سلفات الحديدوز غير المخلبية ونترات البوتاسيوم (في حالة استعمال الحديد في صورة غير مخلبية). وقد سجل Skirvin *et al.* (1986) انخفاض الرقم الهيدروجيني لوسط MS السائلة أو المضاف إليها Difco Bacto بتركيز ٦ جم/لتر من ٥.٧ إلى ٤.٦ عقب التعقيم مباشرة ووصل إلى ٤.١ و ٤.٤ بعد ستة أسابيع من تحضير البيئة السائلة والصلبة على التوالي. ويقلل الفحم المنشط المضاف للبيئة من الانخفاض الحادث عند التعقيم كما يبين جدول رقم (٢-٢١). وتزيد حموضة البيئة سواء كانت معقمة في

الايوتوكلاف أو بالترشيح بطول فترة التخزين. وللحد من ذلك ينصح بأن يكون التخزين في الظلام وعلى درجة حرارة منخفضة في الثلاجة حيث تشير دراسة Owens & Wozniak (1991) إلى عدم حدوث تغيير يذكر في بيئة MS المضاف إليها السكر والآجار عند تخزينها في الثلاجة، لكن انخفض الرقم الهيدروجيني إلى ٤.٩ عند تخزينها في الضوء على درجة حرارة الغرفة. ومن الناحية العملية تظهر المشاكل الآتية إذا كان الرقم الهيدروجيني منخفضاً جداً :

١. عدم ثبات اندول حامض الخليك وحامض الجبريليك.
٢. عدم تصلب الآجار.
٣. ترسيب أملاح الفوسفات والحديد.
٤. عدم ثبات حامض Pantothonic.
٥. إعاقة امتصاص الأمونيا.

سادساً: الضغط الاسموزي للبيئة

من المعروف أن الأملاح غير العضوية تتأين عند إذابتها في الماء، وعلى هذا فإن ضغطها الاسموزي هو محصلة اسموزية عيارية مكونات الملح وليست عيارية الملح نفسه فمثلاً ٠.١ مول من كلوريد البوتاسيوم يعطى نظرياً ضغطاً اسموزياً قدره ٠.٢ حيث أنه يتأين في المحلول إلى ٠.١ مول من البوتاسيوم و ٠.١ مول من الكلوريد. لكن لا يتحقق ذلك عملياً فحساب اسموزية البيئة عملية معقدة جداً وتعتمد على درجة الحرارة والوزن الجزيئي للأملاح وتركيزها ودرجة تأينها. وعملياً يقاس الضغط الاسموزي للبيئة بجهاز الازموميتر، أما الطريقة الحسابية فتعطي قيمة أعلى من الحقيقية. وكثيراً ما يحدث سوء فهم عند التعبير عن تغيير الضغط الاسموزي للمحلول بإضافة مزيد من المادة المذابة. لكن من المؤكد أن ذلك سوف يجعل قيمة الضغط الاسموزي أكثر سالبية، ويقال عندئذ أن الضغط الاسموزي للمحلول ارتفع، والتعبير العلمي الدقيق لذلك هو أن الاسموزية تنخفض (George, 1993).

ولا يتوقف تأثير السكر والمكونات الأخرى للبيئة على دورها المغذى للأنسجة بل أن لها دوراً آخر غير مباشر بتأثيرها على الضغط الأسموزي للبيئة. وهناك العديد من الدراسات التي تبين أهمية الضغط الأسموزي للبيئة في استجابة النسيج. فالضغط الأسموزي أهمية كبرى في حركة الماء والمركبات الذائبة، حيث يتحرك الماء من وإلى الخلايا بناء على التركيز النسبي للمواد الذائبة في المحلول الخارجى والداخلى. ويكون للخلايا القدرة على امتصاص الماء لو كان لها ضغط سالب عالى وينتج هذا الضغط السالب من إذابة مواد لها ضغط اسموزي فى العصير الخلوى. أى أن قوة الامتصاص تتوقف على تركيز العصير الخلوى وتركيز السائل خارج الخلايا وكذلك على الضغط الجدارى للخلايا الذى يعيق الامتصاص. ولشرح الاسموزية تفصيلياً يمكن الرجوع إلى (George, 1993) أو المراجع المتخصصة فى فسيولوجيا النبات لكن المهم الإشارة إلى أن إضافة المواد الذائبة إلى المحلول يجعل الاسموزية والضغط المائى أكثر سالبية.

وفهم من ذلك أن الضغط الاسموزي يزيد للبيئة المحتوية على السكر، فعلى سبيل المثال بيئة MS الخالية من سكر لها ضغط اسموزي ٠.٠٩٥٨ اسمول/كجم (Osm/kg) يرتفع إلى ٠.١٨٦ عند إضافة ٣% سكر على درجة حرارة ٢٥ °م أما بيئة B5 المحتوية على ٢% سكر فضغطها الاسموزي $-0.193 \text{ kpa} = 78 \text{ mOsm/kg}$ على نفس درجة الحرارة. ويبين جدول رقم (٢-٢٢) تأثير تركيز السكر على الضغط الأسموزي لبعض البيئات المعقمة بالترشيح. ويلاحظ أنه بدون تحليل السكر فى البيئة فإن ٨٠ و ٦٠ و ٥٠ % على التوالى من الضغط الأسموزي للبيئات B5 و Schenk & Hildebrandt و MS ترجع إلى إضافة ٣% سكر (Thorpe et al., 2008). أما عند التعقيم بالحرارة فإن تحليل السكر يغير من الضغط الاسموزي والضغط الاسموزي لأملاح العناصر الكبرى للبيئات الشائعة الاستعمال فى زراعة الأنسجة وبعد إضافة السكر مقدراً بوحدات البار والتي تعادل ٥١٠ بسكال وتساوى ٠.٩٨٧ ضغط جوى كما أوضحه Perik (1987) فى جدول (٢-٢٣).

وبالطبع فإن الجهد الاسموزي للبيئة المضاف إليها الأجار أو المواد المشابهة يكون أقل من تلك السائلة. لكن أشار البعض إلى عدم أهمية المواد المصلبة في الجهد الاسموزي للبيئة، فقدّر (Lazzeri et al. 1988) أن ٤% من الجهد الاسموزي لبيئة MS يرجع إلى إضافة ٧ جم/لتر من الأجار، أما النسبة الباقية فترجع إلى الأملاح المعدنية. لكن يجب التلميح إلى أن التركيزات الأعلى من الأجار قد تساعد في التغلب على مشكلة التميؤ الزجاجي وهو ما يشير إلى دور المواد المصلبة في الجهد الاسموزي للبيئة. وفي بعض الحالات يكون تأثير السكر على مزارع الأنسجة راجعاً للضغط الاسموزي وليس جدول ٢-٢٢: تأثير تركيز السكر على الضغط الاسموزي للمحلول (Perik, 1987).

تركيز السكر	الاسموزية (Osm/kg)	الجهد الاسموزي عند ٢٥° م (MPa)		
			مليمول	% وزن/حجم
٠.١	٠.٠١٥	٠.٠٣٧-	١٤.٦١	
١.٠	٠.٠٣٠	٠.٠٧٤-	٢٩.٢١	
١.٥	٠.٠٤٥	٠.١١٢-	٤٣.٨٢	
٢.٠	٠.٠٦٠	٠.١٤٩-	٥٨.٤٣	
٢.٥	٠.٠٧٥	٠.١٨٦-	٧٣.٠٤	
٣.٠	٠.٠٩٠	٠.٢٢٣-	٨٧.٦٤	
٤.٠	٠.١٢١	٠.٣٠٠-	١١٦.٨٦	
٥.٠	٠.١٨٦	٠.٤٦١-	١٧٥.٢٨	
٦.٠	٠.٢٥٣	٠.٦٢٧-	٢٣٣.٧١	
٨.٠	٠.٣٢٤	٠.٨٠٣-	٢٩٢.١٤	
١٠.٠	٠.٣٩٦	٠.٩٨٢-	٣٥٠.٥٧	

جدول ٢-٢٣: تأثير تركيز السكر على الضغط الاسموزي لبعض البيئات المستعملة في زراعة الأنسجة (Perik 1987).

الصفة	البيئة			
	White	Hildebrandt	Heller	MS
الضغط الاسموزي لألاح العناصر	٠.٤٣	٠.٧٦	٠.٩٦	٢.٢٧
الضغط الاسموزي للبيئة مع السكر	١.٤٦	١.٤٦	٢.٢٠	٤.٠٥

لدوره كمصدر للكربوهيدرات، لكن بامتصاص السكر من البيئة يحدث تغيير في ضغطها الاسموزي، وفي تلك الحالات يمكن الاستعاضة عنه ببعض المواد التي تقلل من الجهد الاسموزي دون أن تدخل في عمليات الأيض كالسكريات الكحولية مثل المانيتول والسorbitol، وبذلك يظل الضغط الاسموزي ثابتاً. لكن أشار Steinitz (1999) أن تلك السكريات يمكن أن تدخل في عمليات أيض بعض النباتات ومن ثم يفضل استعمال مركب Polyethylene glycol 4000 (PEG) على الرغم من إشارة Chazen *et al.* (1995) إلى احتوائه على بعض الشوائب السامة لأن وزنه الجزيئي العالي يمنع اختراقه جدر الخلايا. لكن بسبب زيادة تركيز تلك المركبات رفع نسبة حامض الأبسيسك والذي يؤثر بدورة على النمو. كذلك يحفز استعمال PEG 4000 تكوين وانتبات الأجنة الجسدية لكثير من النباتات (Stasolla *et al.*, 2003) لأنها تحد من دخول الماء إلى الخلايا فتحاكي تأثير الإجهاد المائي أثناء تطور الجنين، وقد يستعمل ABA مع PEG لنفس الغرض (Langhansová *et al.* 2004).

تأثير الضغط الاسموزي على النمو والتكشف

نخلص مما سبق إلى أن تأثير البيئات المختلفة على النمو والتكشف يعتمد على تأثيرها الغذائي وضغطها الاسموزي. وقد وجد أن ٧٥% من السكر المضاف للبيئة المستخدمة لمزراعة نباتات *Digitalis* ضرورية لتكوين الأفرع العرضية مباشرة على

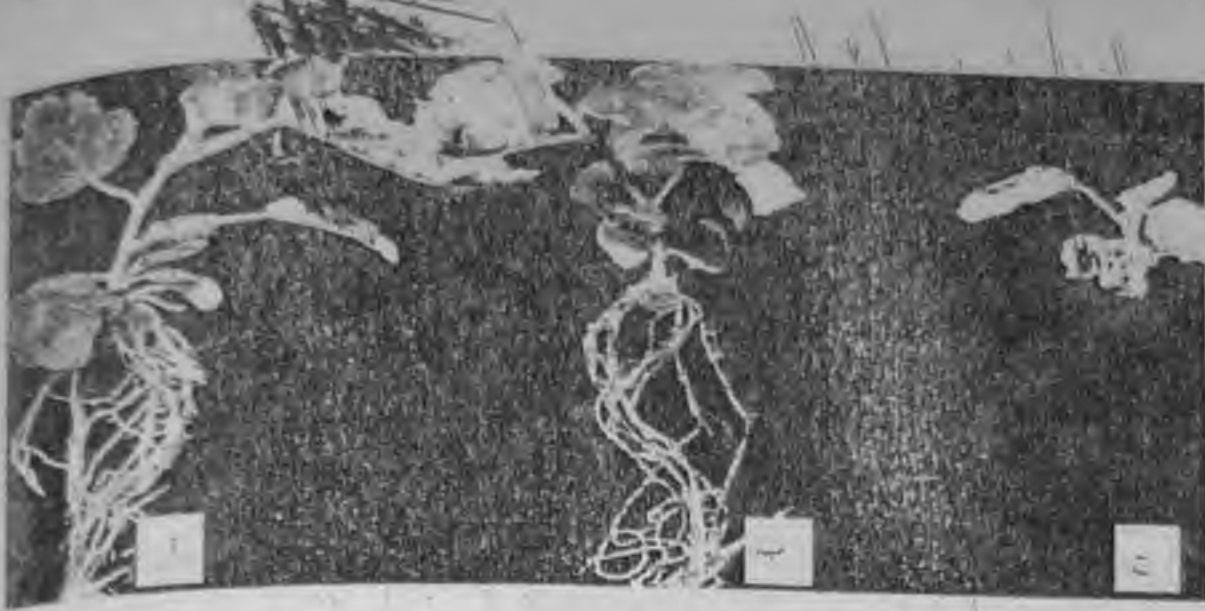
الجزء المنزوع. أما النسبة الباقية من السكر المستخدم فهي لازمة لإحداث الضغط الاسموزي الأمثل لعملية التكشف. لكن تظل ميكانيكية تأثير الضغط الاسموزي على التكشف غير واضحة وإن كان يعتقد أنها تمثل نوع من الإجهاد الذي ربما يشجع تخليق بعض المواد الهامة للتكشف. فمثلاً تفقد الخلايا الموجودة في ظروف بيئية ذات ضغط اسموزي منخفض جزء من مائها بالمقارنة مع تلك الموجودة في وسط ذو ضغط اسموزي مرتفع. ولكي تحافظ الخلية على حيويتها لابد أن يقل ضغطها الاسموزي بعمليات بناء محددة كتراكم البرولين وإلا فإن الماء لن ينتقل للخلايا. وبصفة عامة لو كان الضغط الاسموزي أعلى من ٣ بار فإن النمو والتكشف يقف لمعظم النباتات. ويفترض أيضاً أن الماء الموجود في الخلايا يتم اتزانه قبل الاستطالة والانقسام وعلى هذا فإن الضغط الاسموزي يؤثر في معدل نمو وانقسام الخلايا وتكشفها. ويقل المحتوى المائي للأنسجة بزيادة الضغط الاسموزي للبيئة ويزيد وزنها الجاف. وعادة التركيز المرتفع من السكر غير سام لكن يحدث انخفاض في معدل النمو لعدد كبير من أنواع الخلايا في بيئة MS إذا زاد تركيز السكر عن ٤-٥ %. وقد استخلصت نفس النتائج بإضافة مواد تقلل قيمة الضغط الاسموزي مثل المانيتول والبولي إيثيلين جليكول (Razdan, 2002). ونظرياً يعطى تركيز قدرة مولر واحد من المانيتول ضغطاً اسموزياً يعادل -٢٢.٤ بار. لكن لما كان السكر غير سام للخلايا على الأقل في المدى القصير -حيث أن الخلايا تعاود نشاطها الحيوي مرة أخرى عند خفض تركيزه- فإن زيادة تركيز السكر في البيئة يستعمل لزيادة مدة حفظ المزرعة دون الحاجة إلى تجديدها حيث تسترد الخلايا قدرتها على النمو عقب النقل إلى بيئة ذات تركيز مناسب من السكر.

الاتزان بين الضغط الاسموزي للبيئة والسكر

لو فرض أن الضغط الاسموزي لا يؤثر فعلاً في النمو والتكشف لكان تركيز السكر الأمثل للنمو متبايناً من بيئة لأخرى وكان استخدام تركيز أعلى من السكر

ضرورياً في حالة استخدام البيئات ذات تركيز منخفض من الأملاح. ويبين George (1993) أن أعلى معدل نمو للكالوس في نباتات قول الصويا يمكن الحصول عليه من ٥٠-٧٥% من أملاح بيئة MS مع استعمال ٣-٤% من السكر أو كامل أملاح البيئة لكن بخفض تركيز السكر إلى ٢%. كما أتمت دراسة تأثير تركيز السكر على نمو الكالس والتكشف في نباتات الدخان وأشارت التجارب إلى أن أحسن معدل نمو للكالوس وتكشف الأفرع يحدث عند إضافة ٣% سكر إلى MS. وأمكن الحصول على نفس النتائج عندما استبدل جزء من السكر بالمانيتول ليعطى ضغط اسموزي عالي للبيئة يقدر بـ 0.4-0.6 Mpa وعندما زاد تركيز السكر عن ٣% انخفض التكشف. وكان الضغط الاسموزي لخلايا الكالس التي تكشفت إلى أفرع 0.8 Mpa - أما تلك التي لم تتكشف إلى أفرع فكان ضغطها الاسموزي 0.4 Mpa -.

و غالباً تستخدم بيئة ذات ضغط اسموزي قليل بخفض تركيز الأملاح والسكر لتكوين ونمو الجذور على الأفرع المتكونة في مزارع الأنسجة، حيث أن التركيزات المرتفعة من الأملاح مثبطة لنمو الجذور. ولذا غالباً تستخدم MS بتركيز نصف أو ربع التركيز الأصلي لتكوين الجذور على الأقطاء التي تكونت في المرحلة السابقة في بيئة ذات تركيز عالي من الأملاح. وقد وجد (Alkhubry 2008) أن التركيز الكامل لأملاح بيئة MS هو الأفضل لتكوين الجذور على العقد الساقية لنباتات التين (شكل رقم ٢-٥). ويمثل تركيز الأملاح أهمية أكثر من السكر في مرحلة تكوين الجذور. وقد يرجع هذا إلى أهمية خفض تركيز النتروجين الكلي عن خفض الضغط الاسموزي. كذلك فإن معظم الأشجار يستحث تكوين الجذور عليها في تركيز نصف أو ثلث تركيز MS ولم يكن لتركيز السكر تأثيراً حرجاً عند خفض تركيز الأملاح لكن وجوده يعتبر ضرورياً.



شكل ٢-٥: العقل الساقية لنباتات التين عقب زراعتها لمدة ٤٥ يوم في بيئة MS بتركيز كامل (أ)، ونصف تركيز (ب) وزرع تركيز (ج) (Alkhubry, 2008).

تجهيز البيئة

يتوقف نجاح زراعة الأنسجة على عدة عوامل منها محتوى البيئة من العناصر الضرورية للنمو وتناسب تلك المحتويات مع مرحلة زراعة الأنسجة وهي خمسة مراحل كما هو مبين في الفصل الرابع. فعلى سبيل المثال يتطلب الأمر خفض تركيز الأملاح المعدنية ومصدر الكربوهيدرات في مرحلة تكوين الجذور للعديد من النباتات، على العكس من مرحلة الإستيلاذ التي ربما تحتاج استعمال تركيز عالي من العناصر المعدنية والسكر. كذلك يجب اختيار البيئة المناسبة لتحقيق الغرض المطلوب من زراعة الأنسجة فإذا كان الهدف تخليق المركبات الفعالة فإن الأمر يتطلب إضافة العناصر الهامة في التخليق الحيوي لتلك المركبات. وقد أجريت عدة محاولات للوصول إلى أفضل تركيبة من العناصر الصغرى والكبرى بالإضافة إلى الفيتامينات وأحياناً بعض المواد الأخرى غير محددة التركيب مثل لين جوز الهند وكازين اللبن كمصدر للعناصر الغذائية الضرورية للنمو والتكثف. وكان لاستخدام المحاليل المغذية مثل Hoagland و Knop و Pfeffer في المزارع المائية للنباتات أثر هام في

تطوير تركيب البيئات المستخدمة في زراعة الأنسجة، على الرغم من فشل الكثير من العلماء الرواد في مجال زراعة الأنسجة من استخدام تلك المحاليل لنمو الأنسجة في المعمل. فقد كانت البيئات التي استخدمت في بداية تطوير علم زراعة الأنسجة بسيطة التركيب، وفقيرة في محتواها من العناصر غير العضوية خاصة من البوتاسيوم والنترات. ويعتبر Nobecourt أول من استطاع إنتاج كالوس من نباتات الجزر باستخدام تركيز مخفف من المحلول المغذي Knop. وأعقب ذلك عدة محاولات من مجموعة من العلماء منهم White و Hildebrandt وغيرهم. وقد قام White في الفترة من ١٩٤٣ حتى ١٩٦٣ بالعديد من التجارب بهدف التوصل إلى وسط غذائي مناسب لزراعة الجذور لإجراء بعض الدراسات على الفيرومونات. فقد استغل أحد البيئات التي تستعمل لنمو بعض الطحالب مع إضافة بعض العناصر المعدنية والجايكسين وحامض النيكوتين والثيامين والبيرووكسين. وبالفعل استعملت تلك البيئة لفترة طويلة في زراعة الأنسجة. وقد كان White صاحب الكتاب الأول عن زراعة الأنسجة والذي شجع الكثير من الباحثين لخوض هذا المضمار الجديد.

لوحظ في البداية أن النباتات الكاملة يمكنها النمو في بيئة تحتوي على أيون النترات فقط. لكن لم يناسب ذلك زراعة الأنسجة باستثناء مزارع الجذور. ومن ثم كان معظم التغير في البيئات المستخدمة منصفاً على البوتاسيوم والنترات والكالسيوم. وفي عام ١٩٢٢ تم إدخال الأمونيا إلى بيئة مزارع الأنسجة وكان لها أثراً واضحاً في تحسين نمو عدد كبير من النباتات. وكان لدراسة تأثير تركيز الأمونيا والنترات والبوتاسيوم أعظم الأثر في إمكانية الحصول على بيئة يمكن استخدامها بنجاح مع عدد كبير من النباتات ولأغراض متباينة. فقد أمكن بزيادة تركيز النترات والبوتاسيوم مع وجود الأمونيا تكوين كالوس وإنتاج أشطاء بطريقة مباشرة وغير مباشرة، وكذلك تكوين الأجنة الحسدية. ورغم أن بعض البيئات تم تركيبها لتلاءم صنف نباتي معين فقد

أمكن استخدامها مع أصناف أو أنواع أخرى لكنها قد لا تعطي النتائج المثلى المستهدفة لهذا الصنف أو النسيج.

وكان لاستعمال النتروجين في صورة أيون أمونيوم والنترات بالإضافة إلى تركيز عالي من البوتاسيوم أثر واضح في تحسين نمو الكالس. وعموماً لوحظ أن البيئة المناسبة لمعظم الأغراض تحتوى على ٣٠ مول من النتروجين المعدني والبوتاسيوم. وتستخدم أملاح الأمونيوم بتركيز ٢-٢٠ ملليمول وهذا المدى الواسع من التركيز يكون مشجعاً للنمو أحياناً ومثبطاً في حالات أخرى. وغالباً يعتبر تركيز ١-٣ ملليمول من أملاح الكالسيوم، السلفات، الفوسفات، الماغنسيوم مناسبة لمعظم الحالات. ويوضح جدول رقم (٢-٢٤) تركيب عدد من البيئات الشائعة الاستخدام في زراعة الأنسجة وأشهرها (MS) Murashige & Skoog و (LS) Linsmair & Skoog و B5 و NN. إلا أنه من الصعب أن يوصى ببيئة واحدة لزراعة الأنسجة حيث يتوقف ذلك على النوع النباتي وعمر النبات والجزء المنزرع من النبات.

وأشار (Rout et al. 1999) إلى نجاح الإكثار باستعمال بيئات أخرى مثل LS و (GL) Gamborg's & Lee و (QL) Quorine Lepoivre و Woody plant و (WPM) medium. ووجد (Carelli & Echeverrigaray 2002) أن بيئة QL والتي تمتاز بتركيزها المنخفض من الأمونيا مع رفع تركيز الكالسيوم بالمقارنة مع MS أو B5 مع استبعاد الكلورين تأثير إيجابي في الإكثار الدقيق للورد. حيث تعمل على التغلب على أكسدة المواد الفينولية وبذلك ارتفعت نسبة الأجزاء النباتية التي حافظت على حيويتها من ٢٥-٤٥% إلى ٧٧.٥% مع رفع معدل التكشف. وتختلف الاستجابة لتركيز أملاح MS باختلاف الأصناف المختبرة فعلى الرغم من تفضيل استخدام تركيز منخفض من أملاح تلك البيئة للعديد من النباتات الخشبية فإن (Bressan et al. 1982) أشار إلى أن ضعف نمو وكثرة التباين في النباتات المستنسخة لبعض هجن الورد

يرجع ذلك إلى التركيز المنخفض من الأملاح. والأكثر من ذلك تمكن Podwyszynska & Olszewski (1995) من معالجة إصفرار الأوراق والموت الموضعي للقمم النامية في مزارع الأنسجة بمضاعفة تركيز الكالسيوم، كما حسن زيادة الكالسيوم والمغنسيوم والمنجنيز والحديد من نمو الأشطاء. وقد وجد تأثير إيجابي لنترات الفضة على سرعة ومعدل التكشف.

جدول ٢-٤: مكونات بعض البيئات شائعة الاستعمال في زراعة الأنسجة النباتية.

المكون	البيئة						
	White ¹	Heller ²	MS ³	ER ⁴	B ⁵	Nitsch ⁶	NT ⁷
المركبات غير العضوية (مليجرام / لتر)							
NH ₄ NO ₃	-	-	١٦٥٠	١٢٠٠	-	٧٢٠	٨٢٥
KNO ₃	٨٠	-	١٩٠٠	١٩٠٠	٢٥٢٧.٥	٩٥٠	٩٥٠
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	٧٥	٤٤٠	٤٤٠	١٥٠	-	٢٢٠
CaCl ₂	-	-	-	-	-	١٦٦	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	٧٥٠	٢٥٠	٣٧٠	٣٧٠	٢٤٦.٥	١٨٥	١٢٣٣
KH ₂ PO ₄	-	-	١٧٠	٤٣٠	-	٦٨	٦٨٠
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	١٣٤	-	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	٣٠٠	-	-	-	-	-	-
NaNO ₃	-	٦٠٠	-	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄	٢٠٠	-	-	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₂ .H ₂ O	١٩	١٢٥	-	-	١٥٠	-	-

تابع جدول ٢-٢٤

	٦٥	٧٥٠	-	-	-	-	-
KCl	٠.٧٥	٠.٠١	٠.٨٣	-	٠.٧٥	-	٠.٨٣
KI	١.٥	١	٦.٢	٠.٦٣	٣	١٠	٦.٢
H ₃ BO ₃	٥	٠.١	٢٢.٣	٢.٢٣	-	٢٥	٢٢.٣
MnSO ₄ .4H ₂ O	-	-	-	-	١٠	-	-
MnSO ₄ . H ₂ O	٣	١	٨.٦	-	٢	١٠	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	-	-	-	٨.٦
ZnSO ₄ .4H ₂ O	-	-	-	١٥	-	-	-
ZnNa ₂ .EDTA	-	-	٠.٢٥	٠.٠٢٥	٠.٢٥	٠.٢٥	٠.٢٥
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	٠.٠١	٠.٠٣	٠.٠٢٥	٠.٠٠٢٥	٠.٠٢٥	٠.٠٢٥	٠.٠٢٥
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	-	٠.٠٢٥	٠.٠٠٢٥	٠.٠٢٥	-	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	-	-	-	-	-	٠.٠٣
CoSO ₄ .7H ₂ O	-	١	-	-	-	-	-
FeCl ₂ .6H ₂ O	٢.٥	-	-	-	-	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	٢٧.٨	٢٧.٨	-	٢٧.٨	٢٧.٨
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	-	٢٧.٣	٢٧.٣	-	٢٧.٣	٢٧.٣
Na ₂ .EDTA. H ₂ O	-	-	-	-	٢٨	-	-
Sequestrene 330Fe	-	-	-	-	-	-	-

تابع جدول ٢-٢٤

المركبات العضوية (ميكروجرام / لتر)							
Inositol	٠.٠٥	-	٠.٥	٠.٥	١	٥	-
Pyridoxine-HCl	٠.٠١	-	٠.١	٠.١	١٠	٠.٥	١
Thiamine-HCl	٣	-	٢	٢	-	٢	-
Glycine	-	-	-	-	-	٠.٥	-
Folic Acid	-	-	-	-	-	٠.٠٥	-
Biotin	-	-	-	-	-	-	١٢.٧
Sucrose	٢	-	%٣	%٤	%٢	%٢	%١

¹ White (1884), ² Heller (1953), ³ Murashige and Skoog (1962), ⁴ Eriksson (1965), ⁵ Gamborg (1976), ⁶ Nitsch and Nitsch (1972), ⁷ Nagata and Takeoka (1971).

بيئة Murashige & Skoog

كان Murashige طالباً في معمل Skoog وكانت دراساته تنصب على نمو خلايا نخاع الدخان التي يستخدمها كطريقة للتقدير الحيوى للسيتوكينينات. وقد لاحظ أن إضافة المستخلص المائى لأوراق الدخان إلى بيئة White يشجع نمو مزارع النخاع بشكل ممتاز. وتوصل إلى أن ذلك راجعاً إلى العناصر المعدنية الموجودة بالمستخلص حيث حقق نفس النتيجة باستعمال الرماد المتبقى بعد حرق الأوراق (Vasil, 2008). وبعد هذه الملاحظات الأولية اعتمد هو وأستاذه في تحضير هذه البيئة على تحليل أنسجة النبات لتحديد التركيز الأمثل من العناصر المعدنية في البيئة. وتعتبر هذه البيئة من أشهر البيئات استعمالاً في مزارع الأنسجة حيث تمثل تقريباً ٢٥% من البيئات التي استعملت كما أن ٥٠% من النباتات التي نجحت زراعتها في مزارع الأنسجة كانت باستخدام تلك البيئة (Leifert et al., 1995). يبين جدول رقم (٢-٢٥) تركيز العناصر الأساسية في تلك البيئة ومتوسط تركيزها في النباتات في الظروف الطبيعية (Thorpe et al., 2008).

جدول ٢-٢٥: مقارنة بين تركيز العناصر الأساسية في بيئة MS وأنسجة الأفرع للنبات على أساس الوزن الجاف (Thorpe et al., 2008).

العنصر	في النسيج (مليمول/كجم)	في بيئة MS (مليمول/كجم)	% في النسيج	% في بيئة MS
N	١٠٠٠	٦٠	٦٤.٤	٦٤.٤
K	٢٥٠	٢٠	١٦.١	٢١.٣
Ca	١٢٥	٣	٨.٠	٣.٢
Mg	٨٠.١	١.٥	٥.١	١.٦
P	٦٠	١.٢٥	٣.٩	١.٣
S	٣٠	١.٥	١.٩	١.٦
Cl	٣	٦	٠.١٩	٦.٤
Fe	٢	٠.١	٠.١٣	٠.١١
Mn	١	٠.١	٠.٠٦	٠.١١
B	٢	٠.١	٠.١٣	٠.١١
Zn	٠.٣	٠.٠٣	٠.٠٢	٠.٠٣
Cu	٠.١	٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠٦٠	٠.٠٠٠١
Mo	٠.٠٠١	٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠٠١	٠.٠٠٠١
Ni	٠.٠٠١	٠	٠.٠٠٠٠١	٠.٠٠٠٠

ويتضح أيضاً أن التركيز المنخفض من الكالسيوم والفوسفور والمغنسيوم والنحاس وارتفاع تركيز الكلور والموليبدنيوم بالمقارنة مع أنسجة النبات. كما أن تركيز الأمونيا والنترات فيها أعلى خمس مرات من تلك التي كانت تستعمل سابقاً بواسطة Meller. وكذلك فإن تركيز النتروجين الكلى أعلى عدة مرات من تركيز النتروجين الذي استعمل بواسطة Hildebrandt و White. وأيضاً ارتفع تركيز البوتاسيوم فيها حوالى ١١ مرة أما الفوسفور فقد زاد تركيزه ١٣ مرة هذا بالإضافة لزيادة تركيز العناصر الصغرى. وكان لهذا التعديل الكبير أثراً واضحاً في تحسين النمو والتكشاف.

ورغم أن MS تم تركيبها لتلائم نمو كالوس وأفرع نباتات الدخان إلا أنه ثبت نجاحها لعدد من النباتات الأخرى. ثم أعقب ذلك تحديث مكوناتها وكان معظم التغير في تركيز أيون النترات والأمونيا والبوتاسيوم بينما لم يتغير تركيز معظم الأملاح الأخرى وبعد ذلك أضيفت الأحماض العضوية للبيئة بغرض تحسين النمو أو استعمالها كمضادات أكسدة. وبعد تلك التعديلات وجد أن مستوى الفوسفور منخفض ولا يلاءم عدد كبير من الأنواع النباتية الأخرى، لذا تم تعديل مكونات البيئة بعد ذلك برفع تركيز الفوسفور.

لكن يلاحظ ترسيب بعض العناصر مثل P و Ca و K و N و Zn و Mn فبعد سبعة أيام من تجهيز البيئة يلاحظ ترسب ٥٠% من الحديد و ١٣% من الفوسفات، وقد يحدث الترسيب أثناء التعقيم مما يسبب خلل في تركيب البيئة. لكن يلاحظ من مقارنة تركيز أملاح البيئات شائعة الاستعمال ارتفاع تركيز الأملاح في بيئة MS. لذا استعمل الكثير من الباحثين تركيزات منخفضة من هذه البيئة فقام Pedraza-Santos et al. (2006) بزراعة مستأصلات من نبات *Alstroemeria* cv. 'Yellow King' في بيئة MS ونصف وربع تركيزها بغرض تكشف الأخطاء. وقد كان أعلى معدل لإنتاج الأخطاء عند استعمال نصف تركيز البيئة. لكن كان أطول الأخطاء عند استعمال ثلاثة أرباع التركيز. ولم يتأثر تكوين الجذور باختلاف تركيز الأملاح، وعلى العكس من ذلك أشار Mohamed et al. (2000) أن نصف تركيز أملاح MS أفضل من التركيز الكامل لتجذير أشطاء نباتات *Tagetes minuta*.

بيئة Gamborg (B5)

تم تركيب هذه البيئة بواسطة Gamborg (1976) لنمو معلق خلايا نبات *Glycine max* ويتضح أنها تحتوى على تركيز منخفض من NH_4^+ حيث يُثبط نمو الخلايا إذا احتوت البيئة على تركيز ٢ مليمول من NH_4^+ . كما اختلف تركيز $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ليتراوح بين ١ و ٤ مليمول. وتعد بيئتي MS و B5 من أكثر البيئات

استعمالاً في زراعة الأنسجة بنفس التركيب أو بعمل تحويلات قليلة في محتوياتهما. ومن المهم التأكيد على أن تركيز الأيونات المختلفة في البيئة له نفس أهميته نسبة هذه الأيونات لبعضها البعض بالإضافة للتركيز الكلى من الأيونات. كما إن امتصاص الأيونات المعدنية يتوقف على نسبة سطح المُستأصل النباتي الملامس للبيئة إلى السطح الكلى وما إذا كانت البيئة سائلة أو صلبة. فالجزء الكبير نسبياً من الكالس تكون نسبة سطحه الملامس للبيئة صغيرة بالمقارنة مع حجمه الكلى. وضبط تركيز الأيونات يصبح أكثر أهمية عندما يكون أيون ما مثبط للنمو أو لإحدى العمليات الفسيولوجية لنوع نباتي معين، فعلى سبيل المثال الأنواع الخشبية تنمو بدرجة أحسن عندما يكون تركيز الأملاح الكلى في بيئة MS منخفض لذا يفضل استخدام نصف التركيز. وقد يتحسن النمو عند خفض أيون معين أو أكثر لكن بالطبع يكون هذا محل تجريب لكل نوع نباتي على حده.

اختيار البيئة المناسبة

يتم اختيار البيئة اعتماداً على نوع النبات ومن البديهي أن نستخدم نفس البيئة التي ثبت نجاحها لزراعة نفس الصنف أو البيئة التي ثبت نجاحها مع الأصناف ذات القرابة الوراثية الشديدة. ثم يتم التدريج في استخدام البيئات التي استعملت مع نباتات أخرى من نفس النوع ثم الجنس ثم نفس العائلة ويمكن تحويل مكونات البيئة لتلاءم عمليات التكشف والنمو المختلفة، لكن يجب التنويه إلى أن النمو الأمثل يمكن تحقيقه باستخدام بيئات مختلفة. ومن ثم يمكن محاولة تطوير البيئة التي ثبت نجاحها مع نبات ما لتلاءم نبات آخر. وفي حالة عدم توفر معلومات سابقة عن أنسب بيئة يمكن استخدامها، يتم تجريب التوليفات المشهورة من العناصر الكبرى ولعل استخدام العناصر الكبرى في بيئة MS أو نصف تركيزها مع واحدة أو اثنتين من البيئات الأخرى مناسب لدراسة معظم الأنواع مع ضرورة استخدام نفس التركيز من العناصر

الصغرى والفيتامينات ومنظمات النمو وكذلك السكر. وبعد تحديد أفضل هذه البيئات يمكن البدء فى تغيير تركيز الأمونيا والنترات مع أيونات العناصر الأخرى كالسلفات والفوسفات ويفضل دراسة ثلاث مستويات لكلاً من هذه الأيونات مع ضرورة تكرار كل معاملة أربع مرات.

إعداد البيئة

يمكن شراء البيئات المختلفة المستخدمة فى زراعة الأنسجة جاهزة فى صورة مسحوق يحتوى على كل العناصر والإضافات المختلفة عدا السكر. وتوجد هذه المستحضرات فى عبوات تكفى الواحدة لتحضير ١، ٥، ١٠، ٥٠، ١٠٠ لتر. كما يمكن شراء بعض المكونات مثل العناصر الصغرى أو الكبرى أو فيتامينات إحدى البيئات مثل العناصر الصغرى ل-B5 وفى معظم الحالات يكون هذا النوع من البيئات غير اقتصادى فى الإنتاج التجارى لارتفاع ثمنه. وعند تحضير البيئة معملياً يجب ملاحظة ما يأتى:

١. استعمال كيماويات عالية النقاوة ويفضل شراء الكيماويات فى عبوات قليلة الوزن ما أمكن حتى لا تفسد بالتميو أو التلوث بكيماويات أخرى.
٢. البيئة الجاهزة لا تتكون من نفس الأملاح المكونة للبيئة عند تجهيزها معملياً. بمعنى أنه يمكن أن تحتوى البيئة على نفس تركيز أيونات الكالسيوم مثلاً لكن باستخدام أملاح مختلفة.
٣. يراعى أن يتم استخدام زجاجيات نظيفة جداً وتعقيم الأوعية المستخدمة للزراعة تعقيماً رطباً إذا كانت تحتوى على بيئة سابقة قبل استعمالها للزراعة.
٤. تغطية الأوعية والزجاجات بمجرد غسلها وبعد تجفيفها حتى لا تتلوث بالغبار ويستحسن عدم تخزين الأدوات لمدة طويلة بعد غسلها.
٥. يمكن أن تخزن البيئة بعد تحضيرها لعدة أسابيع على درجة حرارة ٤-١٠ م° أما التخزين فى درجة حرارة عالية فإنه يؤدى إلى تبخير الماء وبالتالي يخلل تركيز المركبات المختلفة.

ويتم تجهيز البيئة بإذابة الأملاح فى الماء ثم ضبط الرقم الهيدروجينى للمحلول وإضافة الأجار وبعد ذلك تصب فى الأوعية الخاصة بالزراعة ثم تعقم. وفى بعض الأحيان يفضل تعقيم البيئة فى كميات كبيرة قبل توزيعها لتلافى حدوث تغير فى الأجار والسكر عند تعقيم كميات قليلة خصوصاً إذا كان الرقم الهيدروجينى منخفض. وإذا كانت البيئة تحتوى على أحد المواد ذات الثبات الحرارى المنخفض كبعض الهرمونات والمضادات الحيوية والإنزيمات فإنها تعقم باستعمال مرشحات ذات اقطار ٥ : ٠.٠ ميكرون ثم تضاف للبيئة المعقمة قبل صبها مباشرة (درجة الحرارة ٤٠°م. ولضمان الإعداد الجيد للبيئة يوصى بأخذ الاحتياطات الآتية:

١. يراعى الدقة فى قياس المحاليل ووزن الكيماويات وعدم تلوث بعضها ببعض ويفضل تخصيص ملعقة لكل نوع من الكيماويات المستعملة لتلافى التلوث.
٢. إذا حفظت بعض محاليل الأساس كالفيتامينات فى المجمد فيجب حفظها فى كميات صغيرة تكفى ١-١٠ لتر حتى لا نضطر إلى إذابة المحلول ثم تجميده عند كل تحضير.
٣. بعد تجهيز البيئة يتم ضبط الرقم الهيدروجينى قبل التعقيم مباشرة.
٤. إذا كانت البيئة المستعملة سائلة يستحسن أن يخفض الرقم الهيدروجينى حتى تقل من ترسيب الأيونات. كما أن انخفاض الرقم الهيدروجينى يقلل من تلوث المزرعة وحيث أن الرقم الهيدروجينى ينخفض أثناء التعقيم فإنه يفضل ضبط الرقم الهيدروجينى على ٦ حتى يصل إلى ٥.٧-٥.٩ بعد التعقيم لكن يلاحظ أن ارتفاع الرقم الهيدروجينى عن ٧-٨ يؤدى إلى ترسيب أيونات الكالسيوم. وهناك طريقة أخرى لضبط الرقم الهيدروجينى بعد التعقيم وإن كانت صعبة من الناحية العملية. فبعد تحضير البيئة يتم ضبط الرقم الهيدروجينى على ٦ ثم يؤخذ جزء صغير وليكن ١٠٠ مل مثلاً ويعقم منفرداً. وبعد التعقيم يعاد ضبط الرقم الهيدروجينى لهذا الجزء ويتم حساب كمية NaOH أو HCl اللازمة لتعديل الرقم الهيدروجينى للبيئة ويتم أضافه هذه الكمية بعد تعقيمها بالترشيح إلى البيئة تحت ظروف تعقيم.

٥. بعد تجهيز البيئة يجب عدم تخزينها مدة طويلة قبل التعقيم حتى لا تنمو عليها الكائنات الدقيقة وبالتالي تغير من المحتوى الكيماوى لها، وقد تفرز بها بعض السموم.

٦. يجب حفظ البيئة بمجرد إعدادها وتعقيمها فى مكان مظلم على درجة حرارة ٥٥°م لمنع البخر.

٧. قد يحدث تلوث للبيئة بعد التعقيم أو لمحاليل الأساس وفى هذه الحالة يجب عدم استعمالها وتعقيمها قبل التخلص منها. ويعرف التلوث الحادث فى المحلول بعدة صفات حسب نوع التلوث فالخمائر تعطى المحلول لون يشبه اللبن أما الفطريات فتتميز بوجود الهيفات. وإن كانت البيئة سائلة وموجودة على هزاز نلاحظ تكوين كرات من الفطر أما التلوث البكتيرى فيلاحظ بوجود عكارة ورائحة تميز بعض الأجناس المختلفة من البكتيريا.

وقد اقترح Gamber أهمية إضافة الأملاح للماء كما هو وارد فى ترتيب مكونات البيئة وذلك لتفادى ترسيب بعض الأملاح فمثلاً يضاف النتروجين المعدنى أولاً حتى لا تترسب أملاح الفوسفات والكالسيوم. لكن لما كان تركيز الأملاح المستعمل لتجهيز البيئة منخفض جداً ومن الصعب الحصول على هذه الأوزان بدقة فإنه يفضل عمل محاليل مركزة والتى تعرف بمحاليل الأساس لواحد أو عدد من الأملاح ثم تخفف للحصول على التركيز النهائى ويوفر ذلك كثيراً من الوقت. وفى الغالب يكون تركيز محاليل الأساس ١٠-٢٠ مرة أعلى من التركيز النهائى، ويتم إعداد المحاليل الأساسية الآتية:

١. العناصر الكبرى بتركيز ١٠ أضعاف التركيز النهائى ويمكن حفظ هذا المحلول بالتلاجة لمدة طويلة كما يمكن حفظها مجمداً أيضاً. لكن يفضل إذابة تلك الأملاح مباشرة عند التحضير.

٢. العناصر الصغرى عدا الحديد يتم إعداد محلول منها تركيزه ١٠ أو ١٠٠ مرة ضعف التركيز النهائى ويحفظ بالتلاجة.

٣. الحديد يتم إعداد محلول بإذابة ٢.٧٨ جم من كبريتات الحديدوز $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و ٣.٧٣ جم من $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ فى ١٠٠٠ مل ماء ليعطى محلول تركيزه ١٠٠ مرة أعلى من تركيز الحديد فى MS ويحفظ فى التلاجة.

٤. الفيتامينات والأحماض الأمينية يتم إعداد محلول الأساس منها بتركيز ١٠٠-١٠٠٠ مرة أعلى من التركيز في المحلول النهائي وتحفظ في المبرد على درجة ٤-٥°م.

٥. يتم إعداد محلول الأساس من منظمات النمو المختلفة بحيث يكون تركيزه ١٠٠ مرة ضعف تركيزه في المحلول النهائي ويحفظ بالثلاجة. ويوضح جدول رقم (٢٦-٢) طريقة تحضير محلول قياسي قوته مليمول واحد من منظمات النمو المختلفة، ويمكن الاستعانة بجدول رقم (٢٧-٢) لتحويل الوزن بالجرام إلى مول.

٦. عند تحضير حجم معين من البيئة يتم إضافة القدر اللازم من هذه المحاليل إلى كمية من الماء تقل قليلاً عن الحجم النهائي ثم يضاف السكر ويكمل الحجم ويضبط الرقم الهيدروجيني. وفيما يلي إحدى الطرق الموصى بها لتحضير ١ لتر من بيئة MS.

١. تذاب الكميات الآتية في ١٠٠ مل ماء مقطر لتحضير محلول أساس (أ) تركيزه ١٠٠ مرة التركيز النهائي

٢٢٣٠ ملجم	MnSO ₄ .4H ₂ O
٨٦٠ ملجم	ZnSO ₄ .7H ₂ O
٦٢٠ ملجم	H ₃ BO ₃
٨٣ ملجم	KI
٢٥ ملجم	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
٢.٥ ملجم	CuSO ₄ .5H ₂ O
٢.٥ ملجم	CoCl ₂ .6H ₂ O

٢. تذاب الكميات الآتية في ١٠٠ مل ماء مقطر لتحضير محلول أساس (ب) تركيزه ١٠٠ مرة التركيز النهائي

٢٨٧ ملجم	FeSO ₄ . 7H ₂ O
٢٣٧ ملجم	Na ₂ EDTA.2H ₂ O

٣. تذاب الكميات الآتية في ١٠٠ مل ماء مقطر لتحضير محلول أساس (ج) تركيزه ١٠٠ مرة قدر التركيز النهائي

٢٠٠ ملجم	Glycine
----------	---------

٥٠ ملجم

Nicotinic acid

٥٠ ملجم

Pyridoxine-HCl

١٠ ملجم

Thiamine-HCl

٤. تذاب الكميات الآتية في ٥٠٠ مل ماء مقطر

١٦٥٠ ملجم

 NH_4NO_3

١٩٠٠ ملجم

 KNO_3

٧٣٠ ملجم

 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

١٧٠ ملجم

 KH_2PO_4

٤٤ ملجم

 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

٥. أضف للمحلول السابق ١٠٠ مليجرام ميوانوزيتول.

٦. أضف ١٠ مل من المحلول (أ) و ١٠ مل من المحلول (ب) و ١٠ مل من المحلول (ج).

٧. أضف ٣٠ جم من السكر.

٨. اكمل الحجم إلى ٩٠٠ مل واضبط الرقم الهيدروجيني ثم اكمل الحجم إلى الحجم النهائي باستعمال كأس مدرج أو ورق معياري.

٩. أضف المادة المصلية اللازمة إلى ورق ثم صب الكمية المحددة من البيئة. يلاحظ أن الوعاء المحتوى على البيئة لا يكون ممتلئ حتى لا يحدث فوران أثناء التعقيم.

١٠. عقم البيئة بجهاز التعقيم الرطب على درجة ١٢١ °م لمدة ١٥-٢٠ دقيقة.

١١. اترك البيئة لتبرد في حمام مائي إلى درجة ٤٠-٥٠ °م ثم صبها في أواني الزراعة بالكمية المناسبة.

١٢. المواد ذات الثابت الحراري المنخفض تعقم بالترشيح وتضاف قبل صب البيئة في أواني الزراعة.

جدول ٢٦-٢: طريقة تحضير المحلول القياسي ١ ملليمول من بعض منظمات النمو.

المركب	ملجم/١٠٠ مل	الذوبان	التخزين المركب المحلول	التركيز الشائع
الأوكسينات				
2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-Indole-3-acetic acid (IAA)	٢٢.١	كحول NaOH	الغرفة	٥-٠.٠.٠١
Indole-3-butyric acid (IBA)	١٧.٥	NaOH	صفر	٣.٠-٠.٠.٠١
α -Naphthalene acetic acid	٢٠.٣٢	NaOH	صفر-٥	١.٠-٠.٠.١
β -Naphthoxy acetic acid	١٨.٦٢	NaOH	الغرفة	٥-٠.٠.١
2,4,5-Trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-Prcloram (PIC)	٢٠.٣٢	NaOH		١.٠-٠.٠.١
Adenin (Ade)	٢٥.٥٦	NaOH		٦.٠-٠.٠.١
Benzyl adenine or benzyl amino purine (BA, N-isopentenylamino purine (2iP)	٢٤.١٢	DMSO	الغرفة	٥-٠.٠.١
Kinetin (KIN)	١٣.٥	ماء		٢٥.٠-٥.٠
Zeatin (ZEA)	٢٥.٢٢	NaOH	الغرفة	٥-٠.٠.٠.١
Gibberellic acid (GA3)	٢٠.٣٣	NaOH	٢٠-صفر	٣.٠-٠.١
Abscisic acid (ABA)	٢١.٥٢	NaOH	الغرفة	٥-٠.١
	٢١.٩٢	NaOH	الغرفة	٥.٠-٠.٠.٠.١
المركبات الأخرى				
Gibberellic acid (GA3)	٢٦.٤٣	كحول	الغرفة	٥-٠.٠.٠.١
Abscisic acid (ABA)	٣٩.٩٤	NaOH	٢٠-صفر	١.٠-٠.٠.١

جدول ٢-٢٧: تحويل تركيز منظمات النمو من ملجم/لتر إلى ميكرومول.

المركب ووزنه الجزيئي / التركيز (ميكرومول)	التركيز									
	Zeatin	TDZ	NAA	Kin	IBA	IAA	GA ₃	2,4-D	Zip	BA
(ملجم/لتر)	٢١٩.٢	٢٢٠.٠	١٨٦.٢	٢١٥.٢	٢٠.٣.٢	١٧٥.٢	٣٤٦.٤	٢٢١.٠	٢٠.٣.٢	٢٢٥.٣
١	٤.٥٦	٤.٥٤	٥.٣٧	٤.٦٥	٤.٩٠	٥.٧١	٢.٨٩	٤.٥٢	٤.٩٢	٤.٤٤
٢	٩.١٢	٩.٠٨	١٠.٧٤	٩.٣٠	٩.٨٠	١١.٤٢	٥.٧٨	٩.٠٥	٩.٨٤	٨.٨٨
٣	١٣.٦٨	١٣.٦٢	١٦.١١	١٣.٩٥	١٤.٧٠	١٧.١٣	٨.٦٧	١٨.١٠	١٤.٨٠	١٣.٣٢
٤	١٨.٢٤	١٨.١٦	٢١.٤٨	١٨.٦٠	١٩.٦٠	٢٢.٨٤	١١.٥٦	١٨.٠٨	١٩.٦٨	١٧.٧٦
٥	٢٢.٨٠	٢٢.٧٠	٢٦.٨٥	٢٣.٢٥	٢٤.٥٠	٢٨.٥٥	١٤.٤٥	٢٢.٦٠	٢٤.٦١	٢٢.٢٠
٦	٢٧.٣٦	٢٧.٢٤	٣٢.٢٢	٢٧.٩٠	٢٩.٤٠	٣٤.٢٦	١٧.٣٤	٢٧.١٢	٢٩.٥٢	٢٦.٦٤
٧	٣١.٩٢	٣١.٧٨	٣٧.٥٩	٣٢.٥٥	٣٤.٣٠	٣٩.٩٧	٢٠.٢٣	٣١.٦٤	٣٤.٤٤	٣٠.٠٨
٨	٣٦.٤٨	٣٦.٣٢	٤٢.٩٦	٣٧.٢٠	٣٩.٢٠	٤٥.٦٨	٢٣.١٢	٣٦.١٦	٣٩.٣٦	٣٥.٤٢
٩	٤١.٠٤	٤٠.٨٦	٤٨.٣٣	٤١.٨٥	٤٤.١٠	٥١.٣٩	٢٦.٠١	٤٠.٦٨	٤٤.٢٨	٣٩.٩٦
١٠	٤٥.٦٠	٤٥.٤٠	٥٣.٧٠	٤٦.٥٠	٤٩.٠٠	٥٧.١٠	٢٨.٩٠	٤٥.٢٠	٤٩.٢١	٤٤.٤٠

الفصل الثالث

منظمات النمو النباتية ودورها في زراعة الأنسجة

على عكس الحيوانات لا تمتلك النباتات جهاز حركى يمكنها من الابتعاد عن عوامل الإجهاد البيئية. ويطلق على المركبات التى تقوم بدور الإشارات البيئية مصطلح الهرمونات النباتية plant hormones أو مواد النمو النباتية plant growth substances وهى مجموعة من المركبات العضوية الموجودة طبيعياً بالنبات والتى لا تلعب دوراً مغذياً بل تتحكم مباشرة وبتراكيزات منخفضة للغاية فى آليات النمو والتطور. أما المركبات المصنعة معملياً والتى تحاكي التأثيرات الفسيولوجية لهذه المركبات فإنها تسمى منظمات النمو النباتية plant growth regulators. ولا يتوقف دور منظمات النمو على توجيهه الخلية للاستجابة للمؤثرات الخارجية فحسب بل من المؤكد أنها تلعب دوراً محورياً فى دورة حياة الخلية نفسها وانتقالها من مرحلة تلو أخرى سواء فى مزارع الأنسجة أو على مستوى النبات الكامل، لكن يجب التأكيد على أن هذه المركبات لا تعد مواد مغذية (Francis & Sorrell, 2001).

وتختلف منظمات النمو النباتية عن تلك الحيوانية فى المدى الواسع من تأثيراتها الفسيولوجية على عمليات التطور التى ترتبط فى نفس الوقت بالنوع النباتى. وكثيراً ما يلاحظ تأثير مساعد أو متعارض لمركبين مختلفين من منظمات النمو فى بعض الحالات. كما يتأثير الفعل الوظيفى لمنظمات النمو بالعوامل البيئية المختلفة، ومن ثم يصبح من الصعب تحديد مدى وكيفية استجابة نبات ما أو بالأحرى عضو معين فى النبات لمنظم نمو. وتم تقسيم هذه المواد إلى عدة مجموعات على أساس تأثيرها الوظيفى وهى تضم الأوكسينات، والسيتوكينينات، والجبريلينات، وغاز الإثيلين. وتعتبر الأوكسينات والسيتوكينينات من أكثر منظمات النمو تحكماً فى النمو والتكشف فى مزارع الأنسجة. أما الجبريلينات وحامض الأبسيسك فيندر استعمالهما فى زراعة الأنسجة ولم يتم

تصنيعهما معملياً بصورة تجارية حتى الآن ويعتمد على المصادر الطبيعية في الحصول عليهما. وبالرغم من ذلك فإن هناك العديد من المركبات المصنعة معملياً والتي تعيق فعل الجبريلينات وتسمى بمضادات الجبريلينات أو معوقات النمو growth retardants. أما غازى الاستيلين والبروبلين فلهما تأثير يحاكي الإثيلين لكن يجب إضافتهما بتركيزات كبيرة لإحداث نفس التأثير الوظيفي. ورغم إمكانية استعمال الإثيلين كمنظم نمو إلا أن صعوبة التحكم في إضافته وتركيزه والذي يتطلب أوعية محكمة الغلق تحد من استعماله في زراعة الأنسجة. لكن تضاف بعض المركبات التي ينتج عنها الإثيلين، كذلك هناك بعض المركبات مثل (ethephon (2-chlorethanesphosphonic acid التي يمتصها النبات ثم يحدث لها تحلل داخلي وينتج منها غاز الإثيلين (Machkova *et al.*, 2008).

التأثير الوظيفي لمنظمات النمو في مزارع الأنسجة

إن تأثير منظمات النمو في مزارع الأنسجة ليس مطلقاً فاستجابة المستأصل النباتي تتوقف على عدة عوامل منها نوع النبات ونوع النسيج وعمره وباقي الظروف المتعلقة بمكونات البيئة والظروف البيئية والتي سيتم تناولها بالتفصيل في الفصل التالي. كما أن هناك مدة زمنية عقب المعاملة لملاحظة أثر منظمات النمو المضافة، وقد يمتد هذا التأثير الوظيفي حتى بعد خلو البيئة منه بل وإلى النباتات الناتجة التي تم نقلها للحقل. فعلى سبيل المثال ترجع زيادة تفرع بعض النباتات كالجريبيرا بعد أقلمتها ونقلها من المعمل إلى التأثير المتبقى للسيتوكينينات المضافة سابقاً لبيئة الإكثار. ويتم تنظيم النمو والتكشف في مزارع الأنسجة عن طريق التداخل والاتزان بين منظمات النمو المضافة للبيئة وتلك الموجودة طبيعياً في النسيج. فقد تعمل بعض منظمات النمو المضافة خارجياً على تحوير المستوى الداخلى للهرمونات بطريقة قد تمتد إلى أكثر من جيل خلوي. ويعتقد أن تأثير كثير من منظمات النمو يكون بطريقة غير مباشرة بتأثيرها على مستوى منظمات النمو الداخلية. وربما يكون تأثير منظمات النمو على التكشف في مزارع

لأنسجة مرتبطاً بدورها في التحكم في انقسام وتكشف الخلية باعتبارها هي المحدد لانتقال الخلية من مرحلة إلى أخرى أثناء دورة الخلية، وبالتالي توجيه الخلية نحو الكشف بالإضافة إلى التحويل في اتجاه الانابيب الدقيقة. وتؤكد ذلك بدراسة التغيير في اتجاه الألياف الدقيقة المكونة للجدار الخلوي في الخلايا أثناء تكشف الأوراق منها. وبزيادة مطاطية الجدر الخلوية وتغيير توجيه الألياف الدقيقة بها تتكون نتوءات على السطح هي بمثابة منشأ العضو الجديد وبالطبع لا بد. وان يقترن ذلك بعملية الانقسام الخلوي (Francis & Sorrell, 2001).

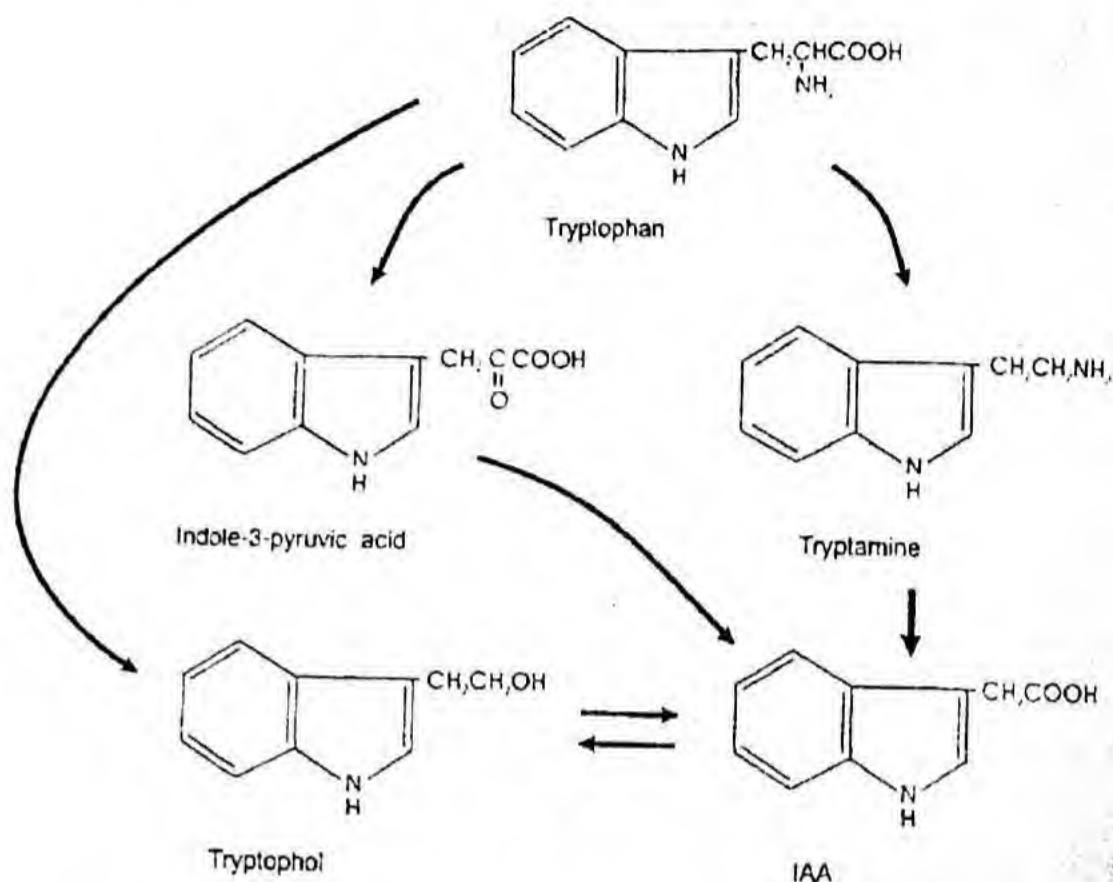
أولاً: الأوكسينات Auxins

تستعمل الأوكسينات بصورة كبيرة في مزارع الأنسجة فربما لا تخلو طريقة إكثار نبات ما -على الأقل في إحدى مراحل الإكثار- من أحد الأوكسينات. وكلمة أوكسين Auxin مشتقة من الكلمة اليونانية Auxein والتي تعنى النمو، وذلك لتأثيره الواضح في نمو النباتات واستطالتها. وهذه المجموعة من منظمات النمو يتم تخليقها حيويًا في القمم النامية للنبات ثم تتحرك حركة قطبية لباقي الأجزاء. ويطلق على الهرمون اسم أكسين لو كان له القدرة على التحكم في عمليات محددة من النمو والتكشف كانقسام واستطالة الخلايا (Cleland, 2004)، كما تتحكم الأوكسينات في السيادة القمية وعمليات الإنبات الضوئي. وفي مزارع الأنسجة يترتب على ذلك نشوء القمم الميرستيمية التي يمكن أن تتكشف إلى أعضاء نباتية أو كالوس وتمتاز الأوكسينات الطبيعية والمخلقة بوزنها الجزيئي المنخفض واحتوائها على حلقة اندول أو حلقة عطرية. وهي عبارة عن بلورات تذوب بدرجة خفيفة في الماء لكنها تذوب جيداً في المذيبات العضوية كالميثانول والإيثانول والاسيتون أو في الأحماض والقلويات الضعيفة. ويرجع اكتشاف الأوكسينات إلى العالم Went في سنة ١٩٢٦ وبعد الإشارة الأولية لتلك المركبات التي تسبب إنحناء غمد ريشة الشوفان نحو الضوء على يد Boysen-Jensen في عام ١٩١٠ توالى

الأبحاث نحو عزل هذه المادة وتعريفها محاولة إيجاد مشابهاة معملية لها. وقد عرف أثر ذلك أن هذا المادة عبارة عن بلورات بيضاء اطلق عليها أندول حامض الخليك IAA ويتم تصنيعه من الحامض الأميني التربتوفان (Manly *et al.*, 2004) كما هو موضح في شكل رقم (١-٣)

ويتم ذلك في القمم النامية لكل من المجموع الخضرى والجذرى كذلك البراعم الطرفية والبراعم الزهرية والأوراق حديثة التكوين وأعناقها. لكن على العكس من اشارة العديد من الدراسات إلى تخليق IAA فى القمم النامية يعتقد (Baker 2000) أن القمم النامية هى مكان لتجميع IAA الذى يخلق فى الأوراق البالغة. وأمكن التعرف على بعض المركبات الطبيعية التى لها تأثير مشابه لأندول حامض الخليك مثل فينائل حامض الخليك. وحيث أنتخلىق IAA داخل النبات يتم من حامض التربتوفان فإن هذا الحامض يلعب دوراً مشابهاً للأوكسين فى بعض مزارع الأنسجة.

ويتوقف تركيز IAA فى المُستأصل النباتى على تركيزه فى النبات الأصل وعمرها وموسم النمو وظروف النمو المختلفة. وفى الأنسجة المتكشفة تلعب الأوكسينات دوراً محورياً فى السيادة القمية والتى يجب كسرها فى بعض أنواع مزارع الأنسجة. ويعتبر (Davies 2004) من أفضل المراجع من حيث تاريخ اكتشاف منظمات النمو ودورها فى النبات بشكل عام. تستخدم الأوكسينات فى تشجيع نمو الكالس والخلايا فى المعلق الخلوى وكذلك الأعضاء فى مزارع الأنسجة كما تعمل على تنظيم عمليات التكشف وخاصة عند إضافتها مع السيبتوكينينات. حيث تستحث الأوكسينات انقسام الخلايا وبدء تكوين مراكز ميرستيمية فى مزارع الأنسجة والتى يمكن تكشفها فيما بعد (Razdan 2002). ووجود تلك المناطق الميرستيمية يشجع من سرعة النمو باعتبار أن هذه المناطق مراكز لتصنيع IAA، لدرجة أن بعض الأنسجة والأعضاء المنزرعة يمكنها النمو دون إضافة اكسين خارجى اعتماداً على مقدرتها على تصنيعه ذاتياً وتسمى هذه الأنسجة auxin habituated أى ذاتية الأوكسين.



شكل ١-٣: مراحل التخليق الحيوي لأندول حامض الخليك (Davies, 2004).

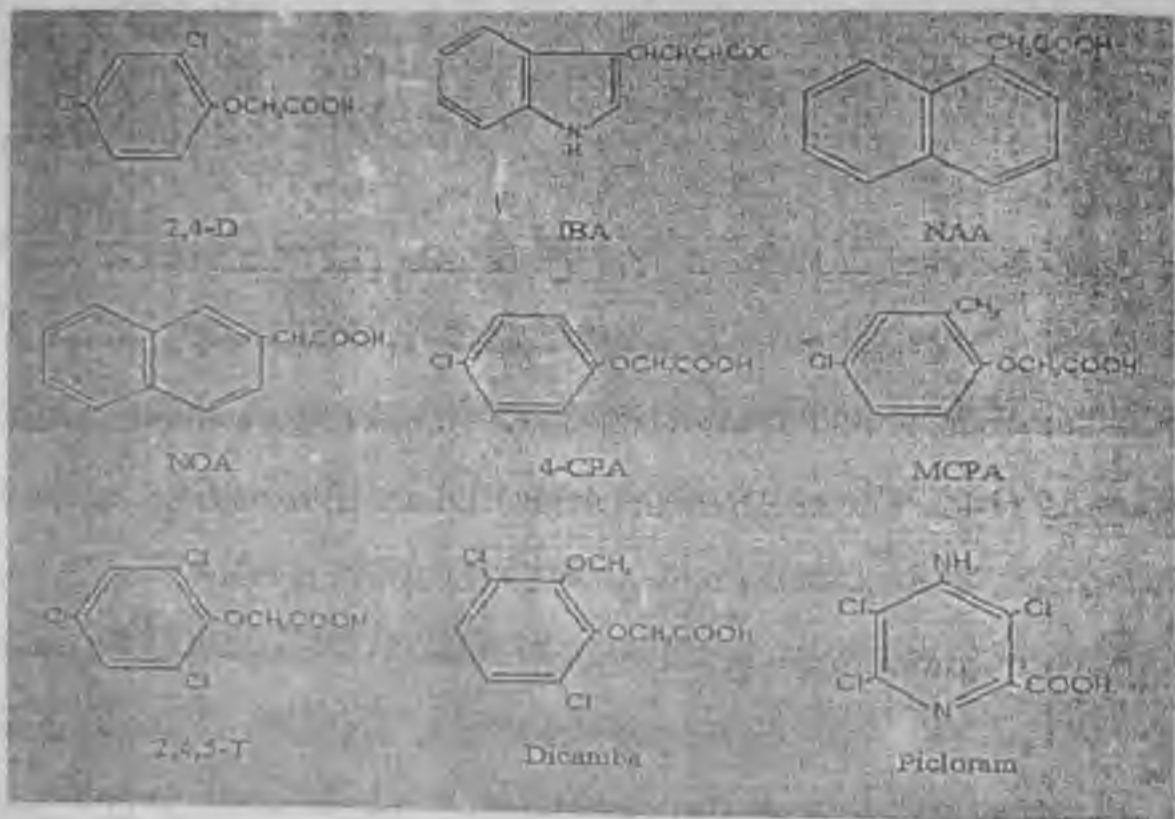
كذلك تبرز أهمية الأوكسين في مراحل تكوين الجذور على النباتات المتكسفة في مزارع الأنسجة، لكن لابد من تحديد توقيت المعاملة فاستحثاث تكوين الجذور يتم في وجود الأوكسين لكن ربما يتطلب الأمر إزالة الأوكسين كلياً أو خفض تركيزه في بيئة نمو الجذور (Pierik, 1987). وتتوقف نوعية الأوكسينات المضافة وكذلك تركيزها على النوع النباتي ونوع النسيج ومحتواه الطبيعي من الأوكسين وقدرة هذا الجزء على تصنيع الأوكسين، وبالطبع يعتبر نوع النمو والتكثف المراد إحداثه عاملاً محدداً لنوع وتركيز الأوكسينات المضافة للمزرعة. وسيتم الاعتماد في دراسة دور الأوكسينات في مزارع الأنسجة على Machkova et al. (2008) والذي قام بتقديم عرض موسع جداً عن الدراسات السابقة في هذا الصدد.

الأوكسينات المصنعة معملياً

على العكس من الأوكسينات المخلقة التي تتسم بالثبات يحدث تكسير سريع لـ IAA الطبيعي المضاف إلى وسط النمو وكذلك داخل الأنسجة المنزرعة عقب امتصاصه. وربما يكون هذا الهدم سواء داخل الأنسجة أو بالانخفاض التدريجي للتركيز في الوسط الخارجى ضرورياً لإحداث التكشف في حد ذاته، ويفسر ذلك باختلاف تأثير الأوكسين على المراحل المختلفة أثناء التكشف. لذا قد ينصح بإضافة IAA مع أحد الأوكسينات المصنعة للحصول على نتائج أفضل. وهناك العديد من المركبات المصنعة معملياً تحاكي الأثر الوظيفي لـ IAA، وأكثر الأوكسينات المصنعة والمستعملة في زراعة الأنسجة هي 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) والذي شاع استخدامه في إنتاج الكالس والمعلق الخلوى لفترات طويلة، لكن قل استعماله حديثاً بعد اكتشاف شدة التغيرات الوراثية التي يسببها وحل محله مركبى 3-indolebutyric acid (IBA) و-1 naphthalene acetic acid (NAA) وهناك بعض الأوكسينات الأقل استخداماً في مزارع الأنسجة مثل 4-chlorophenoxy acetic acid or *p*- chlorophenoxy acetic acid (4-CPA) و 2-naphthyloxyacetic acid (NOA) كما يندر استعمال مركب 2,4,6-trichlorophenoxy acetic acid (2,4,6-T) ويقتصر استخدامه على إنتاج الكالس والتكشف غير المباشر للأجنة الجسدية في النباتات أحادية الفلقة كالأرز. ومن الأوكسينات المصنعة أيضاً مركب 3,6-dichloroanisic acid (Dicamba) والذي يستعمل غالباً لإنتاج الكالس المكون لأجنة جسدية في النباتات أحادية الفلقة، وقد يؤدي نفس الدور في النباتات ثنائية الفلقة أيضاً.

ويجب الإشارة إلى أن التركيزات العالية نسبياً من معظم الأوكسينات على وجه الخصوص 2,4-D و Dicamba و 2,4,5-T و 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram) و 2-methyl-4- chlorophenoxyacetic acid (MCPA) لها

سمية حيوية خصوصاً للنباتات ذات الأوراق العريضة ولهذا السبب يستعمل بعضها كمبيدات حشائش. وهناك أنواع أخرى من مشابهات الأوكسينات لكنها لا تستعمل في زراعة الأنسجة مثل CDPPN ويشير (Tadino et al. 2003) إلى كفاءة بعض المركبات الحديثة مثل 2,4-D و (benzo[β]selenyl) acetic acid (BSSA) -3 في مزارع الأنسجة وتكوين الأجنة الجسدية وهذا ما أكدته (Kevers et al. 2002) في مزارع أنسجة نباتات *Panax ginseng*. ويوضح شكل رقم (٢-٣) بعض الأوكسينات الشائع استعمالها.



شكل ٢-٣: بعض الأوكسينات المصنعة معملياً والمستعملة في زراعة الأنسجة.

ثبات الأوكسينات في مزارع الأنسجة

على العكس من باقي الأوكسينات يُصَف IAA و IBA بالحياسية للحرارة والتحلل الجزيئي عند التعقيم الحراري. ولا يتوقف الأمر عند ذلك حيث يعتبر IAA غير ثابت في المزرعة حتى لو تم إضافته بعد تعقيم البيئة بالترشيح، وينخفض تركيزه في بيئة

MS بمقدار ٩٠% بعد أربعة أسابيع فى الظلام وبدون وضع أى أنسجة فى البيئة. ويزيد تركيز الأملاح والضوء من سرعة التحلل، كما يزيد معدل الهدم فى البيئة السائلة بالمقارنة مع الشبه صلبة. وفى قياس لبيئة MS السائلة على درجة حرارة ٢٥ °م و ١٦/٨ ساعة ضوء/ظلام سجل انخفاض فى تركيز IAA من ١.٧٢ ملجم/لتر إلى أقل من ٠.٠٥ ملجم/لتر بعد ١٤ يوم من الزراعة (Nissen & Sutter, 1988). أما IBA فكان أكثر ثباتاً من IAA وانخفض تركيزه إلى ٧٥% فقط بعد ٣٠ يوم فى الظلام و ٤٠% بعد ٣٠ يوم تحت ظروف الإضاءة السابقة. ويعتبر كلا من NAA و 2,4-D من أكثر الأوكسينات ثباتاً فى بيئات زراعة الأنسجة، لكنهما يرتبطان مع مركبات أخرى وكذلك يتحللان نتيجة الفعل الأنزيمى داخل الأنسجة المنزرعة بمجرد امتصاصها.

النشاط الوظيفى للأوكسينات

تتباين الأوكسينات فى نشاطها الوظيفى بالإضافة إلى درجة تحركها داخل الأنسجة وارتباطها مع المركبات الأخرى وكذلك تحللها بالإنزيمات النباتية. وبناءً على ذلك فإن النوع المستعمل منها وتركيزه الفعال يتم تحديده اعتماداً على التركيب الوراثى، ونوع وحجم المُستأصل النباتى، ومرحلة زراعة الأنسجة. ويلاحظ ارتفاع تركيز الأوكسينات فى كامبيوم النباتات المعمرة فى بداية الربيع حيث تنشط البراعم فى التخليق الحيوى للأوكسينات (Funada et al., 2001) وربما يكون التركيز الداخلى كافياً لتكوين الكالس دون أى إضافة خارجية لمنظمات النمو. وبالرغم من أن الأوكسينات المصنعة متاحة ومستخدمة كبديل لـ IAA من عدة سنوات إلا أنه مازال من غير المعلوم مدى تشابه الفعل الوظيفى لتلك الأوكسينات مع IAA أو مدى تحويلها لفعله الوظيفى فى الأنسجة. وفى كثير من التطبيقات العملية للأوكسينات خصوصاً لإنتاج الجذور يتم خلط أكثر من أكسين واحد. كذلك وجد (Przetakiewicz et al., 2003) أن خلط الأوكسينات أكثر فاعلية فى تكوين الأشطاء لنباتات القمح والتريتيكال والشعير. لكن نظراً لأن تأثير

كل نوع يعتمد على الطراز الوراثي فإنه يفضل استعمال نوع واحد فقط منها. ويكون خلط IAA مع أحد الأوكسينات المصنعة أفضل من استعمال الأوكسينات المصنعة بمفردها. ويمتص الأوكسين عند الرقم الهيدروجيني 5-6 في صورة جزيئات كاملة، وبعد الإمتصاص تهدم داخل الخلايا ببعض الإنزيمات المتخصصة.

تأثير الأوكسينات في زراعة الأنسجة

يعمل الأوكسين بصورة عامة على الإسراع من نمو الأنسجة بتمدد وانقسام الخلايا ويتم ذلك طبقاً لنظريتين هما:

١. ضخ أيون الهيدروجين خلال جدر الخلايا حيث يعمل ارتباط الأوكسين بجدر الخلايا على تكسير الليبيدات المكونة لها. وبذلك تزداد حموضة الجدار وتزداد مطاطية جدر الخلايا ومعدل إمتصاص أيون البوتاسيوم إلى الخلايا لمعادلة أيون الهيدروجين. يترتب على هذا خفض الضغط الاسموزي للخلية وزيادة قدرتها على إمتصاص الماء ومن ثم تتمدد ويؤدي خروج أيون الهيدروجين إلى زيادة حموضة الوسط الخارجي وتنشيط التبادل الأيوني. وبهذه الطريقة يعمل الأوكسين بطريقة غير مباشرة على استحداث تصنيع إنزيم ATPase الموجود في الغشاء الخلوي والمسنول عن نقل أيونات الهيدروجين والهيدروكسيل من وإلى الخلية فتزيد نفاذية الجدر للأيونات الأخرى. وهذه النظرية تعد أكثر النظريات قبولاً لتفسير النمو السريع الحادث للخلايا عند إضافة الأوكسين.

٢. أما النظرية الثانية فتفترض أن الأوكسينات تساعد على زيادة معدل تصنيع الأحماض النووية mRNA. وبالتالي زيادة معدل تصنيع أنواع محددة من البروتينات التي تشجع استطالة الخلايا وانقسامها وقد أمكن تحديد العديد من الجينات التي ينشط تعبيرها الجيني بفعل IAA في روتين Aux/IAAs. وعلى سبيل المثال عند إضافة الكلوروفلوميكول إلى بيئة نمو مزارع أنسجة نبات الدخان لوحظ انخفاض أو عدم

ذلك فإن عمليات تثبيط فعل الأوكسين سواء في البيئة أو بعد امتصاصها في النسيج كالأوكسدة والارتباط تؤثر في النشاط الحيوى للأوكسين. وقد أشار (Davies, 2004a) إلى اختلاف النشاط الحيوى للأوكسين ليس فقط باختلاف النوع النباتى بل من خلية إلى أخرى وكذلك تبعاً للحالة الفسيولوجية للخلية نفسها. ولعل ذلك يشير إلى أهمية تحديد الحالة الفسيولوجية للنبات الأم المستخدم كمصدر للمستأصل النباتى فمن الطبيعى أن تختلف الحالة الفسيولوجية للنبات باختلاف فصول السنة وعمليات الخدمة المختلفة، وسيتم توضيح ذلك بالباب التالى.

ويمتاز التأثير الحيوى للأوكسينات بشكل الجرس حيث يزيد التأثير برفع التركيز فى مدى يتراوح غالباً بين ٠.١ و ١٠ ميكرومول ثم يصبح التأثير سلبى ويرجع ذلك لزيادة تخليق الإثيلين. ويرتبط فعل الأوكسين فى مزارع الأنسجة بنوع وتركيز منظمات النمو الأخرى، لكن قد تمثل كل مزرعة حالة فريدة من حيث استجابتها للأوكسين وربما لا تتحقق نفس النتيجة لو حدث تغيير بسيط فى العوامل الأخرى. وبشكل عام تستعمل الأنواع المختلفة من الأوكسينات فى زراعة الأنسجة بتركيزات متباينة لتحقيق أحد الأهداف الآتية:

١. تكوين الكالس والتكشف

تعمل الأوكسينات على زيادة معدل ارتباط مجموعات الميثيل بالاحماض النووية وبالتالي ترتد الخلية من الحالة المتكشفة إلى الحالة الميرستيمية وتأخذ فى الانقسام وتكوين الكالس. ويشير (Terzi & Lo Schiavo 1990) إلى أن زيادة ارتباط مجموعات الميثيل بالاحماض النووية عن مستوى معين تدفع الخلايا للدخول فى حالة التكشف وتكوين أعضاء أو أجنة جسدية مرة أخرى (Leljak-Levanic et al. 2004). وبالرغم من التأثير الشديد لـ 2,4-D على التغيرات الوراثية فإنه قد يستخدم فى بداية زراعة العديد من النباتات بتركيز منخفض فى مدى ١-٣ ملجم/لتر لدفع تكوين الكالس الذى ينقل لاحقاً

تأثير IAA وكذلك الأحماض النووية المسنولة عن تصنيع إنزيم β -1,3-glucanase الذى يعمل على التحلل المائى لمركب β -1,3-glucanopolysacchrides فى الجدر الخلوية فيؤدى ذلك إلى زيادة مرونتها ومطاطيتها. تؤدى المعاملة بالأوكسين أيضاً إلى إنتاج جزيئات سكر Oligosaccharides النشطة حيويًا .

أما تأثير الأوكسينات على عمليات التكشف فى مزارع الأنسجة فترتبط بنوع النسيج ومدى حساسيته للأوكسين. ويبدو أن الأوكسينات قادرة على تنشيط المعلومات الوراثية والفسولوجية بجينوم الخلية والتي تقود إلى عمليات التكشف. لكن تظل ميكانيكية عمل الأوكسين فى التكشف غير معروفة بالتفصيل حتى الآن. لكن لوحظ أن المعاملة بالأوكسينات تزيد من ارتباط مجموعات الميثيل بالحامض النووى، وقد يكون ذلك مهما لإعادة برمجة الخلية وتحويلها من الحالة غير المتكشفة إلى الحالة المتكشفة حيث استخلصوا فى دراستهم المرجعية الدور الكبير لميثلة الحامض النووى فى عمليات التكشف فى مزارع الأنسجة وتأثير ذلك على عدد وتطور الخلايا الميرستيمية فى الأعضاء المختلفة عبر تحكمها فى التعبير الجينى. ولقد أصبح من المقبول الآن القول أن ميثلة الحامض النووى هى التى تتحكم فى عملية التكشف عبر مجموعة من الجينات الخاصة بالتحكم فى نوعية النسيج. لكن وجد (Dunja et al. (2004 أن معدل ارتباط مجاميع الميثيل بالحامض النووى أثناء المراحل الأولى لتكوين الأجنة الجسدية لا ترتبط بوجود الأوكسين فى البيئة، وقد انخفض هذا المعدل فى مرحلة نضج الأجنة بصرف النظر عن وجود الأوكسين. لكن تؤدى الزيادة الكبيرة فى تركيز الأوكسين المضاف إلى زيادة الخلل الوراثى فى الخلية والمتعلق بارتباط مجموعات الميثيل بالحامض النووى مما يؤدى إلى استبعادها من التكشف. ولتحديد التركيز والنوع المناسب من الأوكسينات لمزارع الأنسجة لا بد أن يؤخذ فى الاعتبار نوع النمو والتطور المستهدف من المزرعة ومعدل امتصاص وانتقال الأوكسين. ويلعب التركيز الداخلى من الأوكسينات فى النسيج النباتى أهمية كبرى فى تحديد التركيز الأنسب الذى يجب اضافته للبيئة. وبالإضافة إلى

إلى بيئة تحتوى على نوع آخر من الأوكسينات. ويكثر الآن استعمال IAA, NAA وبتراكيز عالية نسبياً يصل إلى ١٠ - ٢٠ ملجم/لتر لنباتات الفلقة الواحدة وبعض النباتات من ذات الفلقتين. لكن يجب إضافة بعض السيتوكينينات إلى البيئة مع الأوكسينات لإنتاج الكالس، على الرغم من أن وجود السيتوكينينات ليس ضرورياً لتكوين الكالس. وتعمل الأوكسينات على تفكك الخلايا وانخفاض معدل التكشف في المعلق الخلوى على العكس من السيتوكينينات التى تعمل على بدء تخليق الكلوروفيل فى الكالسات والمعلق الخلوى ثم الدخول فى مرحلة التكشف. لكن ربما يشجع تركيز الأوكسينات العالى فى المعلق الخلوى تكوين الأجنة الجسدية، إذا كانت الخلايا تمتلك القدرة الوراثية لذلك.

تؤكد العديد من النظريات دور الأوكسينات فى تكوين مبادئ الأوراق، حيث يستطيع IAA تغيير الخواص التركيبية للجدار الخلوى وتوجيه الألياف الدقيقة المكونة ربما من خلال تخليق بعض البروتينات الخاصة بذلك، وامكن دراسة ذلك من خلال دراسة التكشف فى بعض طفرات الارابيدوبسيس (Francis & Sorrell, 2001). ويتطلب إحداث التكشف فى مزارع الأنسجة حدوث اتزان بين كلا من الأوكسينات السيتوكينينات، وعندما تكون هذه النسبة منخفضة فإنه يتوقع حدوث تكشف للأشطاء وعند النسبة المرتفعة يتوقع تكشف الجذور. وغالباً تستخدم بيئة محتوية على الأوكسينات فقط فى المرحلة التالية لاستطالة الأفرع لدفعها للتجذير قبل نقلها إلى خارج المعمل (شكل رقم ٣-٣). ويعتبر IBA أكثر الأوكسينات استخداماً لتكوين الجذور على العقل وأشار Van der Krieken *et al.* (1992) إلى تحول IBA إلى IAA عقب امتصاصه، لكن لا يعنى ذلك عدم تأثيره فى صورته الأصلية. وعلى العكس من السيتوكينينات فإن الأوكسينات فى مزارع القوارير تثبط تصنيع الكلوروفيل فى العديد من النباتات، وتعمل مضادات نقل الأوكسين على زيادة تخليق الكلوروفيل (Singh & Syamal, 2000). لكن التركيز المنخفض جداً والذي يصل إلى ٢٠% عن ذلك المستعمل فى إنتاج الكالسة يشجع تخليق الكلوروفيل.



الشكل ١- نباتات كروية الشكل، تنمو في
جذور الكروية (أو الكروية) (أو الكروية)



تتكون الجذور الجانبية من منطقة البريسيكل الملاصق للخشب الأولى وتتحكم الأوكسينات في عدد الجذور التي تتكشف على المستأصل النباتي. كما أن التحرك القطبي للأوكسين (Friml, 2003) من الأقطاب إلى الجذور يشير إلى أن انتقال وتراكم الأوكسين إلى البريسيكل هو الذي ينشط انقسام الخلايا ومن ثم تكشف الجذور. لكن يعتبر مسار الأوكسين في الجذور من العمليات المعقدة والتي تؤثر الكثير من الجدل حيث يشير

البعض إلى أن الأوكسينات ربما تتحرك في اتجاه محدد في أحد الأنسجة بينما تتحرك في الاتجاه المضاد في نسيج آخر. وهذا لا يضعف نظرية دور الأوكسينات في نشو الجذور لكنها توضح أن هذه الإشارة أكثر تعقيداً مما يعتقد. وبالفعل تم الحصول على طفرة من نباتات ارابدوبسس يطلق عليها *alf1* لها القدرة على تخليق كميات عالية من IAA وتميزت تلك النباتات بالقدرة على تكوين الجذور الجانبية. أما نباتات الطفرة *alf4-1* والتي تعاني من نقص IAA فلم تكون جذور جانبية إلا بعد المعاملة بهذا الهرمون، ويرجع ذلك لدور الهرمون في استحثاث انقسام الخلايا في طبقة البريسكل (Celenza *et al.*, 1995). لكن تشير هذه الدراسة أيضاً إلى أن تطور تلك المنشآت الأولى خلال طبقة القشرة يقع تحت تحكم آلية أخرى.

٢. تكوين الأجنة الجسدية

لكن هناك عدد من التجارب التي كانت الاستجابة فيها لا تتطابق مع هذه الفرضية حيث تم استحثاث الخلايا لتكوين الأجنة في بيئة غير محتوية على الأوكسينات، وعلل ذلك بانخفاض محتوى الأنسجة من الأوكسين الطبيعي. ويستمر انقسام الخلايا ونمو الأجنة بعد ذلك متلازماً مع الانخفاض الطبيعي في تركيز الأوكسين والراجع إلى تحلله أو ارتباطه مع مركبات أخرى. لكن سجل (Bozhkov *et al.*, 2002) موت للخلايا وزيادة في درجة حموضة المزرعة عند استبعاد الأوكسين بغرض دفع نمو الأجنة الجسدية لنباتات *Picea abies*.

وباكتشاف تحكم الرقم الهيدروجيني للبيئة في تكوين الأجنة الجسدية لنباتات الجزر، أرجع البعض مثل (Pasternak *et al.*, 2002) تأثير الأوكسينات في تكوين الأجنة الجسدية ولو جزئياً إلى تأثيرها على الرقم الهيدروجيني للجدر الخلوية. لكن يتلزم تطور الأجنة مع إزالة الأوكسين من البيئة ورفع الرقم الهيدروجيني. كما وجد أن الأجنة الجسدية تتكون في البيئات ذات الضغط الاسموزي العالي فالبيئات المحتوية على ٠.٧

مليمول من السكر أو ٠.٠٦ مليمول من المانتول أو ٠.٣ مليمول من كلوريد الصوديوم تشجع تكوين الأجنة الجسدية في الجزر. كذلك فإن التعرض لأيونات المعادن الثقيلة على سبيل المثال ٠.٥-١.٠ مليمول من الكادميوم يشجع تكوين الأجنة وبالطبع لا يرجع ذلك إلى تأثيره على الرقم الهيدروجيني. وهناك تداخل واضح بين تركيز السكر والأوكسينات التي من شأنها استحثاث الخلايا لتكوين أجنة جسدية (Lazzeri et al., 1988). وربما تعمل الأوكسينات المضافة للبيئة على استحثاث فعل IAA الداخلى لتكون الإشارة الاولى لدفع الخلية لتكوين الأجنة الجسدية (Thomas et al., 2002). وقد نجح We et al. (2009) فى تحديد ثمان جينات تلعب دور فى تكشف الأجنة الجسدية منها Aux/IAA المسنول عن تكوين بعض البروتينات الخاصة باستحثاث تكوين الأجنة الجسدية فى كالوسات القطن. ومن هذا العرض السريع لإمكانية استحثاث تكوين الأجنة الجسدية يمكن القول أن ميكانيكية الاستحثاث وفعل الأوكسينات للأجنة الجسدية غير معروفة بشكل تام ولا تتوقف فقط على الرقم الهيدروجيني. وربما تعمل بعض العوامل البيئية بطريقة مباشرة أو غير مباشرة على التأثير على الفعل الأوكسيني.

٣. مزارع الأعضاء

من المؤكد أن الأوكسينات ضرورية لتشجيع نمو القمم الميرستيمية ومزارع القمم النامية على الرغم من السيادة القمية التى تمتاز بها الأوكسينات. ولذا يجب خفض تركيز الأوكسينات لزيادة معدل تكوين الأفرع دون تكوين الكالس فى المرحلة التالية لنمو هذه الأجزاء. لكن تظل هناك أهميه لتحديد نوعية وتركيز الأوكسين المضاف وارتباط ذلك بالنوع النباتي، وتركيز السيتوكينينات المضافة. وتلعب الأوكسينات دوراً هاماً فى مزارع الجذور واستحثاث تكوين الجذور الجانبية (شكل رقم ٣-٤). وتعتبر التركيزات المنخفضة من الأوكسينات هى الفعالة فى استحثاث نشوء الجذور على النباتات فى مزارع الأنسجة. ويرجع تثبيط تكوين الجذور عند استعمال التركيز العالى منها إلى زيادة تركيز الإثيلين فى الخلايا المعاملة بالأوكسينات خاصة تلك المصنعة له (Ali et al.,

(2008 و (Cooke, 2002). وقد يتطلب الأمر معاملة قواعد أفرع نباتات *Juniperus phoenicea* النامية في مزارع الأنسجة بتركيز منخفض للغاية (٢.٥ ميكرومول) ولمدة خمس دقائق فقط قبل زراعتها في البيئة لإستحثات تكوين الجذور على ٤٠% من النباتات بينما نجح ٦% فقط من الأفرع التي زرعت في بيئة محتوية على نفس التركيز في تكوين جذور (Loureiro et al. 2007). ومن المعاملات التي تشجع تكوين الجذور على النباتات إعادة زراعتها في البيئة عدة مرات و خفض شدة الإضاءة لتنشيط ما يعرف بالاستطالة الإظلامية وكذلك اضافة بيئة سائلة فوق البيئة الصلبة (De Klerk, 2002).



شكل ٣-٤: استطالة الأشطاء العرضية وتكوين الجذور لنباتات *Capsicum annuum* في بيئة MS تحتوي على ٢ ملجم/لتر IBA (يمين) وتقرم الأشطاء وعدم تكوين الجذور في بيئة تحتوي على سيتوكينينات فقط (يسار).

تنظيم نشاط الأوكسين

لا يتوقف نمو وانقسام وتكثف الخلايا في مزارع الأنسجة على تركيز الأوكسينات المضافة للبيئة فقط، لكنه يعتمد أيضاً على التركيز الداخلي لـ IAA والتداخل بينهما وكذلك على العوامل المؤثرة على ثبات الأخير. ونشاط IAA الداخلي مهم في

التحكم في النمو والتكشاف فقد وجد أن النباتات التي تعاني من نقص عنصر البورون بها نقص في IAA حيث لا يصنع RNA المسئول عنه ولا يتم الانتقال الطبيعي ل-IAA داخل النبات وينخفض معدل استجابة هذه النباتات للمعاملة بالأوكسين وبالتالي فإن استعمال أنسجة من نباتات تعاني من نقص البورون يتطلب استعمال تركيزات أعلى من الأوكسينات. من الثابت أن IAA حساس للحرارة ويحدث له تكسير جزئي بالتعقيم الحراري، بالإضافة إلى تأثيره بالضوء. لكن حتى بفرض التعقيم بالترشيح فإن IAA لا يعتبر نشط جداً كأوكسين خارجي لتشجيع عمليات النمو والتكشاف بسبب تكثيره في النبات، فبعد ٨ ساعات من إضافته لمعلق خلايا الجزر يكون ٢٠% فقط من الممتص منه في صورة حرة و ٤٥% في صورة مرتبطة مع حامض الأسبريك والنسبة الباقية تتكسر لمركبات أخرى.

وتتفاعل كلا من الأوكسينات الطبيعية والمصنعة مع بعض المركبات داخل الخلايا كما تلتصق مع بعض الجزيئات الصغيرة وتكون ما يسمى بالأوكسينات المرتبطة conjugation كذلك ترتبط مع بعض البروتينات وتكون معقد وبذلك يثبط فعل الأوكسين مؤقتاً. أيضاً تتكون معقدات أخرى باتحاد IAA مع بعض المركبات مثل الاسرات، والجليكوسيدات والأحماض الأمينية. ويبدو أن هذه ميكانيكية فسيولوجية لحفظ مستوى IAA داخل الخلايا. فبتحلل هذه المركبات أنزيميا يتحرر الأوكسين ليعاود نشاطه مرة أخرى، وبذلك تمثل هذه المعقدات حماية للأوكسين من عمليات الأكسدة، والمزيد عن آلية عمل وأيض الأوكسينات من هذا المنطلق يمكن الرجوع إلى Bertos et al. (2008) و Woodward & Bartel (2005). وقد تختلف نسبة الأوكسين المرتبط بين الطرز الوراثية المتباينة، كذلك فإن طبيعة المعقدات المتكونة تتوقف على الأنواع النباتية. كما تتحلل الأوكسينات المضافة خارجياً جزئياً وتثبط داخل الخلايا، فمثلاً يحدث إحلال لذرات الكلور الموجودة في جزء 2,4-D المضاف إلى معلق خلايا القمح بمجموعات هيدوكسيل ثم يرتبط المركب الناتج مع السكر لينتج مركب غير نشط كأوكسين، لكن لو

ارتبط المركب الناتج مع حامض أميني فإنه يكون نشط فسيولوجياً. ينخفض مستوى الأوكسين الحر داخل الأنسجة بسرعة عند المعاملة بأوكسين خارجي كذلك فإن عمليات غسل النسيج النباتي قد تقلل مستواه. وبنقص مستوى الأوكسين الخارجي يتم تحلل المعقدات المتكونة من الأوكسين والمركبات الأخرى للحفاظ على مستواه الداخلي. ولكي يقوم الأوكسين بدوره على الأقل في تنظيم بعض العمليات الحيوية فلا بد أن يرتبط بمواقع بروتينية في الخلية ووجود هذه المواقع المستقبلية للأوكسين هام لإحداث الفعل الأوكسيني (Woodward, 2005). وقد يكون أحد أدوار هذه المستقبلات هو تمرير الأوكسين في الأغشية الخنوية وجعله قادراً على التحرك في السيتوبلازم.

أيض الأوكسين في مزارع الأنسجة

تمتص الأنسجة الأوكسينات المضافة للبيئة بسرعة في صورة جزيئات كاملة عند رقم هيدروجيني أقل من 6. ويرتبط تركيز ال- IAA الداخلي بمعدل التخليق الحيوي له وأكسدة IAA إلى IBA و indole-3-propionic acid (IPA) إلى مركبات غير فعالة بواسطة إنزيمات البيروكسيدز. وبذلك تلعب تلك الإنزيمات دوراً محورياً في ضبط قوى الأوكسين داخل الخلايا. وتوجد هذه الإنزيمات طبيعياً بصور مختلفة تسمى (isoenzymes) داخل خلايا الأنسجة المنزرعة لكنها تتباين بشدة بين الأنواع النباتية، كما يتأثر تركيزها بعدة عوامل أهمها تركيز الهرمونات المضافة للبيئة. ومما لا شك فيه أن هذه الإنزيمات تؤثر على النمو والتكشف بتأثيرها على تركيز الهرمونات الداخلية. وقد أشارت عدة دراسات إلى دور أنزيم peroxidase في المراحل المختلفة لتجذير النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة، ويتوقف تركيز peroxidase في الأنسجة المنزرعة على نوع الأوكسين المضاف. وتوضح نتائج Saxena et al. (2000) الخاصة بتجذير نباتات *Plumbago zeylanica* هذا التباين خلال مراحل مختلفة من الزراعة. ولاحظ أن التباين في تركيز الإنزيم نتيجة المعاملة بتركيزات مختلفة من الأوكسينات كان أشد تأثراً ب- IAA أو IBA عن المعاملة ب- NAA أو 2,4-D.

كما سبق القول يؤثر التركيز الداخلى للإثيلين فى أنسجة النبات والذى يرتبط بدوره بالعديد من العوامل الخاصة بزراعة الأنسجة والتي سيتم مناقشتها فى الفصل التالى على معدل التصنيع الحيوى للأوكسين. وتؤدى المعاملات التى تسبب تغيير فى التركيز الداخلى للإثيلين فى كالوس بعض الأنواع النباتية إلى تأثير شديد فى معدل تكوين وتطور الأجنة الجسدية. حيث ثبت تكوين الأجنة الجسدية فى الأوعية محكمة الغلق بسبب زيادة تركيز الإثيلين. وكذلك أدت المعاملة بتركيز ٠.٠١-١.٠٠ ملجم/لتر من الإثيلين إلى استحثاث تكوين الأجنة الجسدية، ويلاحظ أن مستوى الإثيلين فى هذه الحالة كان أقل من تركيزه عند إحكام غلق الأوعية المستعملة للزراعة. وأيضاً تثبط المعاملة بالجلاكلتوز التخليق الحيوى للأوكسين عن طريق رفع مستوى الإثيلين الداخلى. ومن ناحية أخرى ينظم معدل أكسدة IAA ببعض الإنزيمات مثل IAA-oxidase وتوجد كمية كبيرة نسبياً من المثبطات الطبيعية التى تمنع أكسدة IAA بفعل هذا الإنزيم فى القمم الميرستيمية للأنسجة التى فى حالة الصبا عنها فى الأنسجة البالغة إلا إذا حدث لها جرح. والمسالك الطبيعى لتثبيط هذه المركبات هو وجود المواد المختزلة. حيث تعمل المواد المختزلة مثل NADH والتى تحفظ الخلية فى حالة جهد اختزالى منخفض على تثبيط أكسدة IAA. وبالتالي تلعب مثبطات الأكسدة دوراً هاماً فى انقسام الخلايا وتكثفها.

دور المركبات الفينولية فى النشاط الأوكسينى

يطلق على المركبات التى تحمل واحداً أو أكثر من مجموعات الهيدروكسيل فى حلقة عطرية مشتقات الفينول وقد تكون فى صوره أحادية أو ثنائية أو ثلاثية الكربوكسيل. وهناك العديد من الأبحاث التى تشير إلى دور تلك المركبات فى تنظيم النمو فى مزارع الأنسجة (Sharifian et al., 2009). وتوجد هذه المركبات بصورة طبيعية فى النباتات حيث تعمل ومشابهتها المصنعة معملياً كعامل مختزل بصورة عامة فى الخلايا. بذلك يمكن أن تعتبر كعامل مختزل للإنزيمات المؤكسدة لـ IAA مما يفسر نشاطها كمنظم للنمو

عندما تضاف إلى بيئة مزارع الأنسجة لأنها تحمى الأوكسين من الأكسدة. وقد وجد في بعض التجارب أن المركبات الفينولية تشجع نمو الكالس وتكشف المزيد من الأشطاء بالإضافة إلى تحسن واضح في تجذير الأشطاء المتكشفة. لكن يتوقف ذلك على تركيز الفينولات فنباتات *Eucalyptus tereticornis* المتكشفة من مستأصلات نباتية تم جمعها في الفترة من شهر يوليو إلى سبتمبر كانت ذات مقدرة أعلى على التجذير عن تلك التي جمعت في باقى شهور السنة وقد لاحظ (Das & Mitra (1995 أن ذلك يرجع إلى انخفاض محتوى النباتات من الفينولات في الفترة من يوليو إلى سبتمبر. وقد أظهرت دراسة (Rustaei et al. (2009 تشابه تأثير بعض الفينولات مع الأوكسينات وبالذات IAA، فعند إضافة ١٦٢ ملجم/لتر من phloroglucinol إلى بيئة نمو التفاح زاد معدل تكوين الأفرع الجانبية. وكذلك حفز (Te-Chato & Lime (2000 تكوين الجذور على نباتات *Garcinia mangostana* باستعمال ٣٤.٥ ميكرومول من المركب السابق. ويبدو أن هذه المواد تحاكي فعل الأوكسين عن طريق المواد الناتجة من أكسدتها مثل phloroglucinol و phloridzin. وقد استخلصت نظرية أن وجود إنزيم polyphenoloxidase المؤكسد للفينول يشجع التجذير بأكسدة الفينولات. كما يعمل كلا لمركبين على تثبيط ظاهرة التميؤ الزجاجي لكونهما يادئ لتصنيع اللجنين. كذلك وجد (Hoque & Arima (2002 أن phloroglucinol تحفز كالوس *Trapa japonica* على التكشف.

يتضح مما سبق أن معدل تصنيع الفينولات الداخلية في الأنسجة المنزرعة يؤثر على معدل النمو والتكشف في زراعة الأنسجة بتأثيره على مستوى ونسبة الأوكسينات إلى السيتوكينينات الداخلية، وبصفة عامة يعتبر وجود الفينولات متلازماً مع درجة التكشف. وتجدر الإشارة إلى أن الأنسجة في مرحلة الصبا تحتوى على نسبة عالية من المواد الحامية للأوكسين من الأكسدة على العكس من الأنسجة البالغة وقد يفسر هذا استجابة الأنسجة في حالة الصبا لزراعة الأنسجة بالمقارنة مع الأنسجة البالغة. وتقتراح

بعض الملاحظات على المستوى الطبيعي للمواد الحافظة للأكسين أن مستوى هذه المواد يكون منخفضاً في مرحلة بدء تكوين الجذور ثم يرتفع في مرحلة نمو الجذور. وذلك لأن التركيزات المرتفعة من الأوكسينات لازمة لبدء تكوين الجذور بينما يحتاج نمو الجذور إلى تركيز أقل. وقد لوحظت أهمية انخفاض تركيز IAA في البيئة أو في المستأصل النباتي في بعض عمليات التكشف فقد أكد (Guan et al., 1997) احتياج العقل الدقيقة للنفاح في مرحلة تكوين الجذور لتركيز مرتفع في البداية ثم تركيز منخفض لتشجيع نموها عقب ذلك. فيعتقد أن الأفرع النامية في المعمل تحتوي على تركيز منخفض من الفينول في مرحلة بدء تكوين الجذور ومستوى أعلى أثناء نمو الجذر. ويلاحظ انخفاض مستوى الفينول عند نقل النباتات إلى بيئة نمو الجذور مع زيادة نشاط إنزيم البيروكسيداز. أدت المعاملة ببعض المشابهات الفينولية مثل phloridzin و catechol إلى المحافظة على التركيز الداخلى من IAA تحت ظروف الإضاءة العالية. وقد وجد Ascencio- (2008) Cabral et al. أن إضافة 3 جم/لتر من phloridzin إلى بيئة إنبات الأجنة الجسدية لنباتات *Carica papaya* تمنع النمو الزحاجى للنباتات وترفع نسبة الإنبات لزيادة معدل تخليق اللجنين.

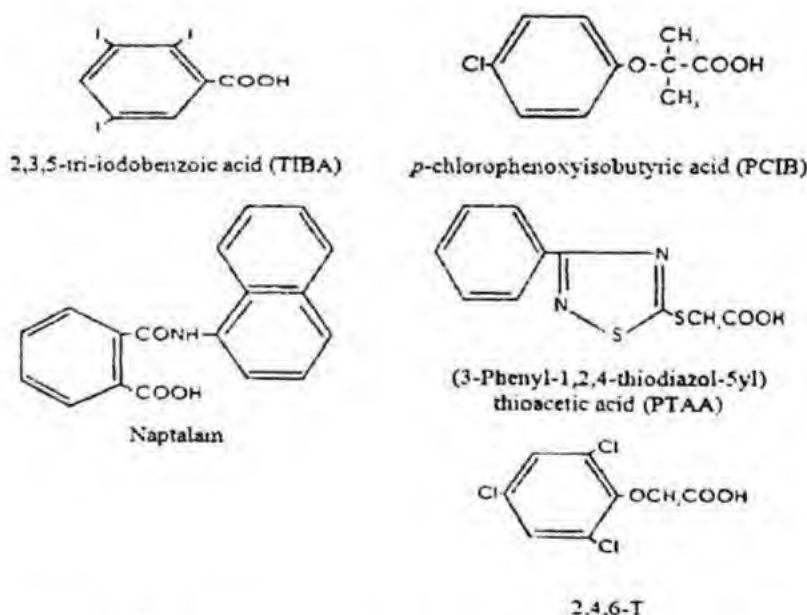
وهناك العديد من المركبات الأخرى التى تصنف ضمن الفينولات مثل coumarins ولها تأثيرات فسيولوجية فى بعض العمليات الحيوية كتصنيع البروتين والكربوهيدرات، والتنفس، والفسفرة الضوئية لكن تظل ميكانيكية عملها غير واضحة على وجه الدقة. وبإضافة تركيزات منخفضة من هذه المركبات يتضح تأثيرها الإيجابى فى مزارع الأنسجة بتأثيرها المعاون لـ IAA، أما التركيزات العالية منها فهى منشطة لأنزيمات الأكسدة. وقد لاحظ (Nandi et al., 2002) أن كلا من IBA و coumarin تشجع تكوين الجذور على عقل *Cedrus deodara*. وشجعت إضافة tyrosine إلى بيئة كالوس نخاع الدخان عملية التكشف وفسر ذلك بأن بعض الإنزيمات تحولها إلى coumarins الذى يعمل بدوره على حفظ IAA من الأكسدة (Tartoura et al., 2004)

تأثير الأوكسينات الخارجية ومضادات الأوكسينات على مستوى IAA

ربما تعمل الأوكسينات المصنعة عند إضافتها إلى مزارع الأنسجة على المحافظة على مستوى الـ IAA الداخلى بمنع أكسدته، أو بتثبيط فعل إنزيم IAA-oxidase. وقد فسر تثبيط 2,4-D للتكشيف فى بعض المزارع إلى النقص المتزايد فى نشاط IAA-oxidase عند تعرض الأنسجة لـ 2,4-D لمدة طويلة. ويسترد المستأصل النباتى قدرته على التكشيف بنقله إلى وسط خالى أو منخفض التركيز من الأوكسينات لزيادة تركيز الإنزيم فيحدث التكشيف وتكوين الأشطاء. من المعروف أن الأوكسينات هي المجموعة الوحيدة من منظمات النمو التى تتحرك داخل النبات بنظام قطبى من القمم النامية إلى أسفل. كما تنتقل الأوكسينات لمسافات بعيدة عبر الأوعية الناقلة (الحاء غالباً). وتحفظ الخلايا بمنحنى تركيز للرقم الهيدروجينى عبر الغشاء البلازمى ويكون الجدار الخلوى أكثر حامضية من السيتوبلازم. مما يمكن IAA الذى يوجد فى الوسط الحامضى فى صورة غير مرتبطه من دخول الخلية بالانتشار عبر السيتوبلازم. أما فى الوسط القلوى فيحدث تأين للمعقدات المحتوية على IAA ويتحرر ليمر عبر الغشاء الخلوى. لكن الحركة إلى خارج الخلية لا تتم إلا إذا التصق IAA مع جزيئى حامل، وترجع الحركة القطبية لوجود هذا الحامل فى قاع الخلية.

واستعمل البعض مجموعة من المركبات أطلق عليها مضادات الأوكسين وهذه المركبات تعمل على إيقاف حركة الأوكسين داخل النبات المُعامل أو الأنسجة المنزعة، لكن ميكانيكية عمل تلك المركبات معقدة وغير معروفة بالتحديد. ومن هذه المركبات مركب (TIBA) 2,3,5-tri-iodobenzoic acid والمركب المعروف بـ (3-Phenyl-PTAA) 1,2,4-thiodiazol-5-yl thioacetic acid وكذلك N-1-Naphthaylphthalamic acid (naptalam or NPA) (شكل رقم ٣-٥). ويجب التنويه إلى عدم صحة تسمية كل تلك المركبات بمضادات الأوكسين حيث أنها لا تنافس

الأوكسين في الارتباط بمستقبلاته في الخلية لكنها تضاد انتقال الأوكسين. فتقوم هذه المركبات بالارتباط بالحامل الناقل لـ IAA مما يمنعه من الارتباط بالأوكسين فيعيق حركته إلى خارج الخلية، وتم فعلاً تحديد بعض هذه المواقع. ففي خلايا الدخان حدد موقعين أحدهما خاص للارتباط بالأوكسين والآخر من الممكن أن يرتبط بالأوكسين أو naptalam أى هناك علاقة تنافسية بين الأوكسين ومضاد الأوكسين في الارتباط بالحامل. لكن لو كان الفعل المثبط لمضادات الأوكسينات يتوقف فقط على نقل الأوكسين في الجذر الخلوية فإنه من المتوقع أن يزيد كلا المركبين في النسيج المعامل بهما، وهذا غير مطابق للنتائج حيث يزيد TIBA إمتصاص IAA في المعلق الخلوي خاصة في الوسط الحامضي. وما زال الفعل الحقيقي لمضادات الأوكسينات غير معروف بدقة (Machakova et al., 2008).



شكل ٣-٥: التركيب الكيميائي لبعض مضادات الأوكسينات

وقد أظهرت مضادات الأوكسينات مثل phenylpropionic acid , β -NAA و TIBA أثراً فعالاً في بعض مزارع الأنسجة وبخاصة في عمليات الكشف عند إضافتها لبينة الزراعة (Zhang et al., 2004). فتركيز ٥٠ ملجم/لتر من naptalam منع نمو

كالوس الدخان وشجع تكشف الأشطاء في وجود IAA. ويبدو أنه يشجع تكوين السيتوكينين أو يقلل من نشاط الأوكسين حيث أن الكالس الذي زرع في بيئة محتوية على ٠.٤ ملجم من الكينيتين و ٥٠ ملجم/لتر naptalam كون أشطاء، لكن عند إزالته من البيئة لم تتكشف الأشطاء. وكذلك فإن (PCIB) *p-chlorophenoxyisobutyric acid* يعيق الفعل التثبيطي لـ 2,4-D في تكشف الأشطاء. وقد تحتوى بعض الأنواع النباتية على تركيز عالى من الأوكسين الداخلى الأمر الذى يكون غير مناسب لتكوين البراعم العرضية، وبإضافة تركيز منخفضى حدود ٠.٠١-٠.١ ملجم/لتر من TIBA تكشف أشطاء في مزارع أنسجة نبات *Pelargonium*، كما وجد Kaparakis & Alderson (2003) أن TIBA ينشط تكوين الكالس لنباتات *Capsicum*. وربما عملت مضادات الأوكسين في هذه الدراسة على عدم انتقاله إلى أماكن الكشف فزادت نسبة السيتوكينينات إلى الأوكسينات مما شجع الكشف. أيضاً تؤثر مضادات الأوكسينات ومضادات انتقالها على عملية تكوين الجذور فقد ثبت TIBA تكوين الجذور على عقل السويقة الجنينية العليا للطماطم (Tyburski & Tretyn, 2004). واستعمل TIBA بتركيز ١ ملجم/لتر بإضافة فطتين منه فوق قمم الأفرع النامية من الورد كبديل لقرط القمم النامية لتشجع نمو الأفرع الجانبية. أما إضافته بتركيز ٣ ملجم/لتر فشجعت إنتاج الأشطاء في مزارع هجن الورد (Voyiatzi & Voyiatzi, 1988). واستخدمت مضادات الأوكسين أيضاً في تكوين الأجنة الجسدية في مزارع متك الشعير والذرة وكان لـ TIBA تأثير أفضل من بعض الأوكسينات في إنتاج كالوس ذو مقدرة على إنتاج أجنة جسدية.

لاحظ Nakano et al. (2000) انخفاض معدل تكشف كالوسات نباتات *Lilium formosanuma* بتقدم عمر المزرعة وبالتحديد بعد ٧٢ شهر من التأسيس حيث كان معدل تكشف البراعم العرضية من قطع الكالس هو ١٠% فقط وكان معدل تكوين الأشطاء أقل من فرع واحد لكل قطعة كالوس. ولاستعادة قدرة الكالس على التكشف تم إضافة عدة منظمات النمو إلى البيئة وهى NAA و PIC و TBA و 6-

N-phenyl-N-1,2,3-thiadiazol-5- و benzylaminopurine (BA or BAP) ylurea (Thidiazuron or TDZ) وكان المركب الوحيد الذى له قدره على استحثاث التكشف من الكالس هو TIBA. ومن ثم تم إضافته بعدة تركيزات إلى بيئة التكشف وجود TDZ, BA وتوضح النتائج المبينة فى جدول رقم (٣-١) إرتفاع نسبة التكشف وعدد الأشطاء الناتجة من الكالس عند إضافة TIBA إلى بيئة النمو. كذلك كان هناك تداخل بين السيٲوكينينات المستعملة وTIBA مع عدم التأثير على حيوية الكالس. وأمكن التغلب على عدم تكوين جذور على بعض الأشطاء المتكشفة فى هذه البيئة بزراعتها مرتين فى بيئة خالية من منظمات النمو. ومن هذا يتضح أن الانخفاض فى معدل التكشف بتقدم عمر المزرعة قد يرجع إلى عوامل فسيولوجية خاصة بالأوكسينات حيث أمكن استعادتها بمثبطات نقل الأوكسين وليس لتراكم التغييرات الوراثية كما يفترض كثير من الباحثين. لكن لم يكن لنفس المركب دوراً فى استعادة القدرة على تكوين أجنة جسدية والتي يفترض أنها تعتمد على توزيع محدد للأوكسين داخل الكالس المنزرع وليس تثبيط حركته كلياً.

ثانياً: السيٲوكينينات Cytokinins

تمثل السيٲوكينينات وهى مشتقات من القاعدة النتروجينية البيورينية الأنين إحدى أهم مجموعات منظمات النمو النباتية والتي تم التعرف عليها فى الخمسينيات من القرن الماضى. وتلعب هذه المجموعة دوراً أساسياً فى انقسام وتكشف الخلايا فى مزارع الأنسجة كما أن لها العديد من التأثيرات الفسيولوجية الأخرى، فهى تلعب دوراً فى تحمل النبات للإجهاد البيئى كالملوحة والجفاف يتم ذلك على المستوى الجينى للخلية حيث تحفز السيٲوكينينات الجينات ذات العلاقة بعملية نسخ وإنتاج mRNA الذى يتم فى النهاية ترجمته إلى بروتينات تعمل على زيادة قدرة الخلية على تحمل الإجهاد. ويتم ذلك بطريقة مباشرة أو غير مباشرة بفعل بعض العوامل الأخرى كبعض منظمات النمو التى يشجع تجهيزها بفعل السيٲوكينينات.

جدول ١-٣: تأثير TDZ و BA و TIBA على تكشف الأجنة الجسدية من كالوس *Lilium formosanuma* عمر ٧٢ شهر (Nakano et al., 2000).

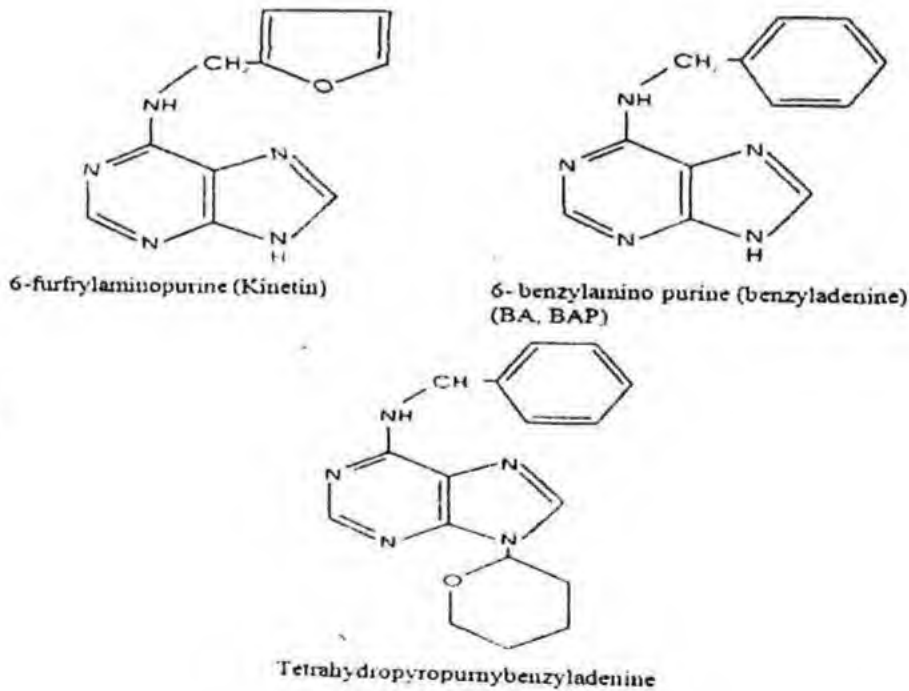
للكالوس المنتج %				% لحيوية الكالس	منظمات النمو (ميكرومول)		
المتوسط/كالوس	براعم	أجنة جسدية	أجنة جسدية		TDZ	BA	TIBA
٠.١	٠.٨	٠.١	٠.٣	١٠٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠
٠.٠	٠.٨	٠.٠	٢.٤	١٠٠	٠.٠	٠.٥	٠.٠
٠.٠	٠.٦	٠.٠	٩.٦	١٠٠	٠.٠	٥.٠	٠.٠
٠.٠	٠.٩	٠.٠	٩.٣	١٠٠	٠.٥	٠.٠	٠.٠
٠.٠	٠.٦	٠.٠	٠.٨	٨٥.٣	٥.٠	٠.٠	٠.٠
٠.٠	٣.٣	٠.٠	٦.٤	١٠٠	٠.٠	٠.٠	٠.٥
٠.٠	٧.٩	٠.٠	٥.٣	١٠٠	٠.٠	٠.٥	٠.٥
٠.٠	٨.٥	٠.٠	٠.٢	١٠٠	٠.٠	٥.٠	٠.٥
٠.٠	٨.٣	٠.٠	٨.٩	١٠٠	٠.٥	٠.٠	٠.٥
٠.٠	٩.١	٠.٠	٣.٥	٨٥.٧	٥.٠	٠.٠	٠.٥
٠.٠	٣.١	٠.٠	٥.٧	٩٦.٣	٠.٠	٠.٠	٥.٠
٠.٠	٩.٤	٠.٠	٧.٤	١٠٠	٠.٠	٠.٥	٥.٠
٠.٠	٨.٥	٠.٠	٨.٣	١٠٠	٠.٠	٥.٠	٥.٠
٠.٠	٩.٨	٠.٠	٥.٢	٨٨.٢	٠.٥	٠.٠	٥.٠
٠.٠	٨.٨	٠.٠	٧.٧	٨٨.٨	٥.٠	٠.٠	٥.٠

القيم مسجلة بعد ٣ شهور من نقل كالوس بأقطار ١-٣ مم إلى بيئة الكشف

كما اتضح أن للسيتوكينينات دوراً في تنشيط تصنيع البروتين وربما لنفس السبب تعمل السيتوكينينات على تشجيع نضج البلاستيدات الخضراء وتأخير الشيخوخة في الأوراق المفصولة من النباتات وكذلك على كسر طور السكون لبعض النباتات. وعند إضافة السيتوكينينات إلى أجزاء من النسيج النباتي فإن تلك المناطق تصبح مناطق جنب

للأحماض الأمينية من المناطق المجاورة. وتأثير هذه المركبات على النبات الكامل يكون أقل نسبياً عند مقارنة ذلك بفعلها في مزارع الأنسجة (Davies, 2004b).

وكان مركب الكينيتين المبين في شكل رقم (٦-٣) أول مركب اكتشف من السيتوكينينات وقد عزل بواسطة Miller في سنة ١٩٥٦ بتعقيم الحيوانات المنوية لأحد أنواع الأسماك. وحديثاً تم عزل الكينيتين من بعض المستخلصات النباتية (Barciszewski *et al.*, 2000). وعندما كان Skoog يجرى محاولات لتشجيع نمو كالوس الدخان في وسط مغذى لاحظ أن معدل نمو الخلايا قد زاد في وجود IAA إلا أن النمو توقف بعد ذلك. وبإضافة لبن جوز الهند أو مستخلص الخميرة عاودت الخلايا النمو مرة أخرى.



شكل ٦-٣: التركيب الكيميائي لبعض السيتوكينينات.

وحاول Skoog عزل هذا المركب المشجع لانقسام الخلايا والذي عرف أنه من مشتقات البيورين. وعلى الرغم من ذلك يعتقد أن الكينيتين ليس من السيتوكينينات

الطبيعية وأن المركب الذي تم عزله أولاً وصنف على أنه من السيتوكينينات هو إعادة تركيب لمركب آخر. وتم الآن تحديد أكثر من ٢٥ مركب طبيعي تتشابه مع الكينيتين في التركيب وتوجد في صورة حرة أو مرتبطة غالباً في صورة جليكوسيدات أو رايبوسيد ومنها Zeatine و Zeatin riboside و 2iP dihydrozeatin ويوجد الزياتين طبيعياً في صورتين cis و trans والصورة cis هي النشطة بيولوجياً. وحديثاً اكتشف Stirk et al. (2003) وجود هذه الصورة بنسبة كبيرة في بعض الأعشاب البحرية والتي يمكن استخدام مستحضراتها للتحكم في نمو النباتات في الحقل أو المعمل. وبجانب الصورة الحرة يوجد الزياتين في صورة جليكوسيدية مرتبطة. وعلى الرغم من وجود السيتوكينينات في أنسجة النبات الكامل إلا أن العديد من الأنسجة المنزرعة والأعضاء الصغيرة ليست لها القدرة على تصنيعه بكمية كافية للنمو خصوصاً في النباتات ذات الفلقتين، لذا لابد من إضافة السيتوكينينات إلى بيئة النمو. ويمكن استخدام مقدار النمو الحادث في خلايا الكالس كمقياس حيوى حساس لتقدير وجود السيتوكينينات. ومع هذا فبعض كالوسات النباتات عريضة الأوراق قد لا تحتاج إلى السيتوكينينات لمقدرتها على تصنيعها. وقد تم عزل كالوس لعدد من النباتات وحيدة الفلقة قادراً على النمو في غياب السيتوكينينات. وبزراعة هذه الخلايا مع خلايا أخرى نيس لها القدرة على تصنيع السيتوكينينات أظهرت الأخيرة استجابة ونمت (Van Staden et al., 2008). وتحدث السيتوكينينات تأثيرها بتركيزات منخفضة للغاية ويتضح تأثيرها بدرجة أكبر في مزارع الأنسجة عند إضافتها مع الأوكسينات حيث يحدث استحثاث لانقسام الخلايا والتكشف كما تحد من ظاهره السيادة القمية وتحرير البراعم من السكون. أى يمكن القول أن السيتوكينينات تضاد تأثير الأوكسينات.

تأثير الأدينين في مزارع الأنسجة

كانت أول ملاحظة على تأثير الأدينين في زراعة الأنسجة هي تشجيعه لاننبساط أقرص الأوراق المفصولة المعاملة به والطافية في محلول سكرى. كذلك أدت إضافته

بواسطة Skoog & Tsui فى سنة ١٩٤٨ إلى تكوين البراعم ونمو الأشطاء من العقل الدقيقة لنباتات الدخان. لكن نشاط الأدينين عموماً أقل من نشاط السيٲوكينينات، وقد قدر أنه أقل بـ ٢٥-١٠٠ مرة من النشاط الحيوى للكينيتين. وقد أوضح Dickinson *et al.* (1986) أن الأدينين الموسوم بالأشعة يدخل بمعدل بسيط جداً فى تخليق الكينيتين الذى استخلص من الأجزاء الخضرية لنباتات الطماطم. لكن وجد (Palni 1984) أن الأدينين الذى أضيف إلى مزارع كالوس *Vinica rosea* يدخل فى تركيب الزيٲاتين بعد ساعة واحدة فقط من إضافته للبيئة. وزاد معدل وجوده بها طردياً بزيادة الزمن ولم يتبقى منه فى البيئة إلا ٠.٢% بعد ١٢٥ ساعة من التحضين. وبصرف النظر عن حقيقة أن نشاط السيٲوكينينات راجعاً إلى كونها مشتقات الأدينين فإن الأدينين نفسه مازال يستخدم فى زراعة الأنسجة لإحداث التكشف وتحسين النمو والاستجابة التى تعزى إما لدخوله فى تخليق السيٲوكينينات أو تأثيره المباشر، فقد تبين من بعض التجارب أن تأثيره لا يتضح إلا فى وجود السيٲوكينينات. ومن الممكن أن يكون لحامض الاديك والادينوسيك نفس تأثير الأدينين لكن بدرجة أقل. وقد يعرف الأدينين على أنه فيتامين B4 ويصنف أحياناً فى تركيب بعض البيئات على أنه ضمن الفيتامينات. وغالباً ما يضاف الأدينين بتركيز ٤٠-٨٠ ملجم/لتر لإنتاج الأجنة الجسدية، كذلك يضاف فى وجود السيٲوكينينات لتشجيع التكشف غير المباشر للأشطاء. كما استعمل أيضاً فى زراعة القمم الميرستيمية لتشجيع نموها وأحياناً تكون إضافته لها أساسية للنمو على أساس التركيب الوراثى ونوع السيٲوكينينات المضافة.

وبالرغم من كثرة استعمال الأدينين فى زراعة الأنسجة فإن ميكانيكية عمله غير واضحة بشكل تام ولا يعتقد أن تأثيرها يرجع ببساطة إلى كونها مصدر للنروجين المختزل. وإن كانت نظرية تشجيعه لتصنيع السيٲوكينينات داخلياً صحيحة لكن من المفترض أن يكون أكثر تأثيراً من السيٲوكينينات المضافة خارجياً. وتعتبر السيٲوكينينات الطبيعية والمصنعة مشتقات البيورين والتى يتم تكسيرها فى النبات ويتكون منها الأدينين.

ومن ثم فإن أحد نظريات تأثير الأدينين في تشجيعه للنمو هي أن الزيادة منه تعمل على إعاقة تكسير السيبتوكينينات في نظام التثبيط العكسي feed-back inhibition أو بالتناقص مع الإنزيمات التي تشارك في أيض السيبتوكينينات. وهناك نظريات أخرى في هذا الصدد تشير إلى أن الأدينين يعمل كبادئ لتصنيع الزياتين لكن يتم ذلك بمعدل بطى (Van Staden *et al.*, 2008). وعموماً لا تؤدي المعاملة بالأدينين دوماً لتأثير إيجابي. فاستعمال سلفات الأدينين بتركيز ٣٠-٣٠٠ ملجم/لتر ثبتت تكشف الأخطاء من درنات البطاطس. كذلك فإن إضافة نفس المركب إلى مزارع الأفرع لنبات القرنفل أدى إلى انخفاض معدل تكوينها من القمم النامية المنزرعة وشجع نمو الساق الأساسي، أي أنه يشجع السيادة القمية. ويفضل استعمال سلفات الأدينين عن الأدينين لأنها أكثر ذوباناً في الماء، وبقي أن يقال أن التركيز الشائع استعماله من الأدينين هو ٢-١٢٠ ملجم/لتر.

التخليق الحيوي للسيبتوكينينات

توجد السيبتوكينينات في صورة حرة أو مرتبطة داخل النبات وبدراسة التعبير الجيني للجين IPT في الارابيدوبسيس أشار (Miyawaki *et al.*, 2004) إلى أن السيبتوكينينات تخلق في مناطق مختلفة من أنسجة النبات ويبدو أن الجذور وبالأخص القمم النامية لها هي المكان الأساسي لتجهيزها. كما يتم تخليقها في الأماكن التي لها القدرة على الانقسام كأنسجة الكامبيوم والبذور حديثة التكوين وقد يكون معدل الانقسام البطيء في المناطق الساكنة من الجذور راجعاً إلى نقص تركيز السيبتوكينينات فيها. وتعمل بعض الإنزيمات الخاصة باكسدة أو نزع الهيدروجين من السيبتوكينينات على تثبيط فعلها في بعض الأنسجة فالجين CKX في الارابيدوبسيس منوط به تخليق بعض الإنزيمات التي تعمل على هدم غير عكسي للسيبتوكينينات (Sakakibara, 2006). وبالرغم من أن الجذور المفصولة من كالوس الدخان يمكنها النمو في وسط خالي من منظمات النمو لا يحدث تكوين ونمو براعم عرضية ولا تتكشف أفرع إلا إذا كانت البيئة محتوية على

السيٲوكينينات أو كانت البراعم متصلة أو متطورة مباشرة من كالوس متصل بجذور. لأن كمية السيٲوكينينات التى ربما تخلق فى القمم النامية للأشطاء اقل بكثير من تلك المخلفة فى قمم الجذور. وتنتقل السيٲوكينينات من الجذور عبر أوعية الخشب إلى باقى النبات، ولذا فإن العصارة المتجمعة من أوعية الخشب عند قطعها تكون عالية فى محتواها السيٲوكينيٲى ويمكن أن تشجع نمو الخلايا المنزرعة. وقد تتكون السيٲوكينينات فى أنسجة الأفرع لكن بكميات قليلة بالمقارنة مع تلك المصنعة فى الجذور.

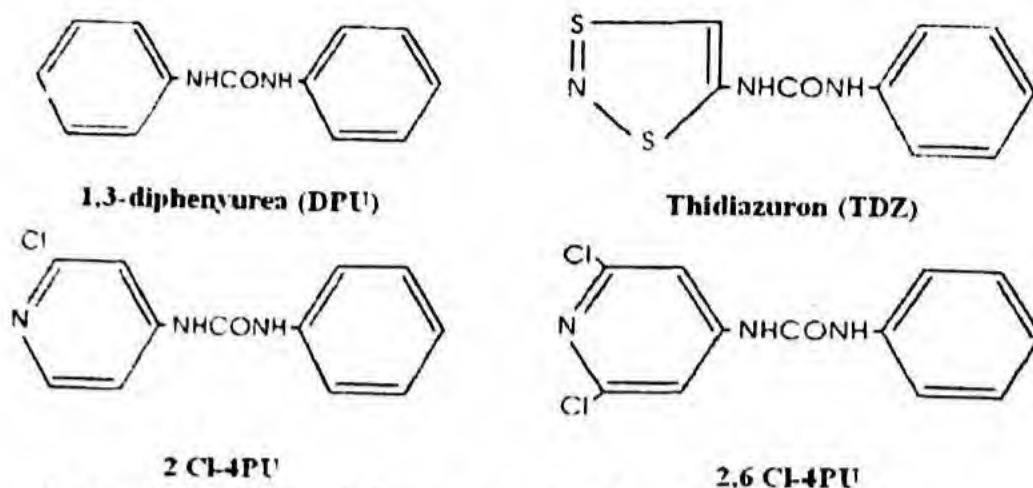
السيٲوكينينات المصنعة

رغم استعمال الزياتين و 2iP فى أبحاث زراعة الأنسجة إلا أن إرتفاع سعريهما يعد عائقاً أمام الاستعمال التجارى لهما فى زراعة الأنسجة. ومن ثم تمت عدة محاولات لإيجاد مواد مصنعة رخيصة الثمن تحاكي فى فعلها السيٲوكينينات وهى مشتقات الأدينين مثل 6-furfrylaminopurine (Kinetin) و benzylamino purine (benzyladenine, BA, BAP) وتعتبر أكثر تأثير من السيٲوكينينات الطبيعية فى كشف الأشطاء فى مزارع الأنسجة. ويلاحظ أن العديد من المركبات التى لها نشاط سيٲوكينيٲى أو تأثير مضاد للسيٲوكينينات لها تأثير مضاد للفطريات وقد تستخدم كمبيد فطرى مثل benomyl ذوالتأثير المشابه للسيٲوكينين فى زراعة أنسجة فول الصويا والفجل لكن بدرجة أقل من الكينيتين. لكن يسبب هذا المركب ضرر لبعض المزارع خصوصاً فى الأوانى المغلقة لذا لا يستخدم عملياً كبديل للسيٲوكينينات. وقد أدى استعمال مستخلص الخميرة ولبن جوز الهند إلى تشجيع نمو الكالس حيث يحتوى الأخير على الزياتين ومركب 1,3-dihphenylurea ومركبات أخرى مشتقة من اليوريا لها تأثير مشابه للسيٲوكينينات.

بعد معرفة النشاط السيٲوكينيٲى للمركب *N,N*-diphenylurea (DPU) والمبين فى شكل رقم (٣-٧) استخدمت مشتقاته فى زراعة الأنسجة. وفى بعض التجارب كانت

مركبات الفينيل يوريا أكثر تأثيراً من السيتوكينينات (Huetteman & Preece, 1993) ، فعلى سبيل المثال مركب 4PU-CI له نشاط فسيولوجى يعادل ١٠٠ مرة نشاط مركب BAP فى مزارع كالوس الدخان. وعند استخدامه فى مزارع أنسجة الأزاليا تكشف أعداد أكبر من الأشرطة بالمقارنة مع الزياتين و 2iP وفى نفس النبات السابق وجد أن مركب Thidiazuron (TDZ) أدى إلى إنتاج عدد أكبر من الأشرطة لكنها كانت أقل من ناحية الجودة حيث كانت متقرمة وممتلئة بالماء بالمقارنة مع استعمال 2iP. ويعتبر مركب Thidiazuron أفضل من السيتوكينينات الطبيعية ومشتقات الفينيل يوريا حيث أن له نشاط يصل إلى ١٠.٠٠٠ مرة نشاط DPU. ولذا يستعمل فى المساعدة على كشف الأشرطة فى الأشجار خصوصاً تلك التابعة لعائلة Oliaceae. ووجد أيضاً أن TDZ يشجع إنتاج الأشرطة فى بعض نباتات الفلقة الواحدة ذات الأهمية كقصب السكر. لكن قد يسبب TDZ تقزم فى الأشرطة الناتجة حيث وجد (Al-Juboory et al. (1998 أن عدد الأشرطة المتكشفة من زراعة أجزاء من نباتات *Gardenia jasminoides* فى بيئة محتوية على ١٥ ميكرومول من TDZ كان أعلى بسبعة أضعاف تقريباً من عدد الأشرطة المتكون فى بيئة محتوية على نفس التركيز من مركب 2iP، لكن كان طول الأشرطة لايتجاوز ١ سم أما الأشرطة المتكونة فى بيئة محتوية على 2iP فكان متوسط طولها أطول من ٣ سم. وبصورة عامة زاد طول الأشرطة بانخفاض مستوى السيتوكينينات.

ولتوضيح تباين التأثير الوظيفى لأنواع وتركيز السيتوكينينات المصنعة قام Tsuro et al. (1999) بإضافة BA و TDZ ومركب N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenyllurea (2Cl-4PU or CPPU) إلى بيئة زرع بها الكالس الناتج من زراعة أوراق *Lavandula vera* فى بيئة تحتوى على 2,4-D والكينيتين. فلاحظ وجود مناطق خضراء اللون فى الكالس المنزرع فى بيئة محتوية على BA تكشف منها بعد



شكل ٣-٧: التركيب الكيميائي لبعض مركبات مشتقات الفينيل يوريا.

ذلك أشطاء بصورة فردية. أما الكالس المنزرع في بيئة بها TDZ و CPPU أصبح لونه اخضر شاحب وما لبث أن تكشفت عليه براعم عرضية بعدد كبير كونت كتل من الأشطاء. لكن تكونت بعض النباتات الخالية من الكلوروفيل عند زراعة الكالس في بيئة بها TDZ ويوضح جدول رقم (٣-٢) النتائج بعد ٨ أسابيع من الزراعة. وقد امتد أثر السيتوكينينات المستعملة إلى مرحلة التجذير حيث فشلت الأشطاء المتكشفة في البيئات المحتوية على TDZ و CPPU في تكوين جذور وماتت في هذه المرحلة على العكس من الأشطاء التي تكشفت في البيئة المحتوية على BA. ويعتقد أن هذه المجموعة تعمل على تثبيط إنزيمات أكسدة السيتوكينينات مما يوحي بأن لها نشاط سيتوكيني.

تأثير السيتوكينينات في زراعة الأنسجة

إن طريقة تأثير السيتوكينينات مازالت غير مؤكدة حتى على الرغم من دورها المؤكد في انقسام الخلية. وهناك أدلة على وجود ارتباط بين السيتوكينينات وتصنيع الأحماض النووية والبروتينات الضرورية للإنقسام. وقد ثبت دخول السيتوكينينات في تصنيع الحامض النووي RNA لإحتوائها على مجموعة الأدينين والتي تعتبر إحدى القواعد النيتروجينية الأساسية في هذا الحامض، وبذلك افترض البعض أن طبيعة عمل السيتوكينينات ترجع إلى دخولها مباشرة في تصنيع الأحماض النووية بالذات t RNA

كما وجد أنها ترتبط في مكان محدد مع RNA الخاص بالحمضين الأمينيين السيرين والتايروزين ولها وظيفة متخصصة في تنظيم العمل الوظيفي بين mRNA و tRNA على أسطح الريبوسومات. لكن لا يعتقد أن دور السيتوكينينات يتوقف على دورها في تصنيع الأحماض النووية فقط، فقد وجد أن لها دور في تنشيط تخليق بعض الإنزيمات.

جدول ٢-٣: تأثير ثلاثة أنواع من السيتوكينينات على تكشف الأشطاء من كالوس أوراق *Lavandula vera* . كما بينه (Tsuru et al. 1999)

السيتوكينينات	التركيز (مليمول)	عدد الكالسات المنزرعة	عدد الكالسات المكونة أشطاء	% للكالوسات المكونة أشطاء
BA	٠.٤٤	٨٩	١	١.١
	٢.٢٠	١١١	١٢	١٠.٨
	٤.٤٠	١٥٠	٨٠	٥.٣
	٢٢.٠٠	٩٠	٨	٨.٩
	٤٤.٠٠	١٢٥	٥	٤.٠
TDZ	٠.٤٥	٦٠	٢	٣.٣
	٢.٣٠	٥٩	٢	٣.٤
	٤.٥٠	١٦٠	٤٥	٢٨.١
	٢٣.٠	١٥٠	٣٤	٢٨.٧
	٠.١	٧١	١	١.٤
CPPU	٠.٢	٨٥	٢	٢.٤
	٠.٤	١٥٠	٧٨	٥٢.٠
	٢.٠	٦٠	٧	١١.٧
	٤.٠	١٠٠	٠	٠.٠

ويجب الإشارة أيضاً إلى أن التأثير الحادث في تخليق الأحماض النووية لا يتطابق مع نشاطها الوظيفي السريع. يجب الإشارة هنا إلى أهمية تأثير الضوء على فعل السيٲوكينينات في مزارع الأنسجة ففي الضوء العاى أو الأشعة الزرقاء أو الحمراء البعيدة تأثر تكشف الأشطاء بشءة في نباتات *Prunus* بفعل BA على معدل تدفق الفوتونات، لكن لم يكن هناك تأثير لمعدل تدفق الفوتونات في حالة الضوء الأحمر. وفي حالة عدم تعريض المزرعة للضوء فإن هذا الهرمون يثبط استطالة الأشطاء Baraldi *et al.* (1988). وقد أرجع البعض فعل السيٲوكينينات كمضادات للإكسينات حيث تعمل على تثبيط إنزيم IAA oxidation. ووجد (Kirkham & Holder 1981) أن الكالسات التى تتكشف منها الأشطاء بفعل أضافة السيٲوكينينات تكون عادة منضغطة وخلاياها ذات جدر صلبة وجهدها الأسموزى مرتفع بحيث تصبح ذات قدرة على امتصاص الماء من البيئة على العكس من الخلايا الغير منتجة للأشطاء حيث تكون مفككة وجدرها رقيقه وممتلئة بالماء وهذا عكس ما يلاحظ عند استعمال الأوكسينات.

يحدث إمتصاص سريع للسيٲوكينينات في مزارع الأنسجة، وتعمل بعض الإنزيمات الطبيعية مثل الاكسيديز على تحويل فى السلسلة الجانبية للزياتين و 2iP لكنها لا تؤثر على dihydrozeatine. ويفسر (Blakesley & Lenton 1987) عدم تأثير أنواع محددة من السيٲوكينينات فى مزارع أنسجة بعض الأنواع النباتية إلى التكسير السريع للمركبات السابقة بهذه الإنزيمات، وقد ارتبطت السلسلة الجانبية للزياتين فى كالوس نباتات *Gerbera jamesonii* مع سكر الريبوز لينتج مركب له نشاط سيٲوكينيى بعد عشر ساعات من المعاملة بالزياتين، لكن اختفى المركب الجديد بعد ٣٠ ساعة من المعاملة وخلق الريبوسيد ومشتقات أخرى من تحلل السلسلة الجانبية للزياتين. فى العديد من الأنواع النباتية يتم تنشيط إنزيم السيٲوكينين اكسيديز عن طريق الإضافة الخارجية للسيٲوكينينات فقد لوحظ أحياناً أن السيٲوكينينات الخارجية تعمل على خفض تركيز السيٲوكينينات الداخلية فى بعض النباتات، والعكس فى بعضها، وربما تكون هذه طريقة

لحفظ مستوى السيتوكينينات فى الأنسجة. وتوجد أنزيمات أخرى فى بعض النباتات تعمل على تكسير البنزىل أدنين، وقد لوحظ فى مزارع الأنسجة لنبات *G. jamesonii* كسر السلسلة الجانبية للكينيتين وأحياناً يحدث هدم لـ BA بهذه الطريقة. لكن يجب توضيح أن تكسير BA إلى مركبات تحتوى على الرايبوسيد لا يعنى عدم نشاطها السيتوكينينى (Van Staden & Drewes, 1992) كما أن المركبات الناتجة قد تكون بمثابة مركبات مخزنة يعاد تخليق BA منها.

ويتوقف تأثير السيتوكينينات فى زراعة الأنسجة على نوع المركب المستعمل، تركيزه، نوع المزرعة، نوع النبات، مرحلة النمو الفسيولوجية للنبات. فقد يكون أحد السيتوكينينات دون الآخر فعالاً فى إنتاج البراعم العرضية تحت نفس الظروف. ولذا قد يستدعى الأمر إضافة أكثر من نوع من السيتوكينينات لإحداث تأثير معين. فقد وجد (Purohit & Singhvi, 1998) أن إضافة الكينيتين إلى بيئة تكشف الأشرطة من البراعم الجانبية لنبات *Achras sapota* فى وجود BA شجعت من تكشف الأشرطة على الرغم من عدم وجود فروق جوهرية لإضافة الكينيتين. والأهم من ذلك هو أن الأشرطة الناتجة عند إضافته لم تتطور بعد نقلها إلى بيئة خالية من السيتوكينينات على العكس من الأشرطة المتكشفة فى بيئة بها ٢ ملجم/لتر BA حيث استطالت وأمكن تكوين الجذور عليها وأقلمتها، ويمكن توضيح استعمال السيتوكينينات فى مزارع الأنسجة فيما يلى:

١. انقسام الخلايا وتكوين الكالس

يبدو أن السيتوكينينات ضرورية لانقسام الخلايا وفى غيابها يلاحظ تأخر فى حدوث الطور الإستوائى (metaphase) وليس التمهيدى (prophase) ويقترح أن السيتوكينينات لها دور فى تصنيع البروتينات المسؤولة عن تكوين خيوط المغزل. وفى حالة نقص السيتوكينينات يتوقف الانقسام الخلوى فى إحدى مراحل الانقسام، وبإعادة نقل الأنسجة إلى وسط يحتوى عليها تعاود الخلية نشاط الانقسام مرة أخرى. ويرجح أن يكون

انقسام الخلية في الوسط الخالي من السيتوكينينات راجعاً إلى محتواها المرتفع من السيتوكينينات الداخلية بالقدر اللازم للانقسام أو أن الخلايا لها القدرة على تصنيع السيتوكينينات كخلايا نبات *Oxalis*. وقد سجل تكوين الكالس والجذور عند زراعة العقل الساقية لبعض الطرز الوراثية من الطماطم في وسط يحتوى على الأوكسين فقط بينما انخفض معدل تكوين الكالس وتكشفت الأشطاء العرضية عند استعمال السيتوكينينات فقط (شكل رقم ٣-٨). وبالفعل تم تقدير كميات مرتفعة من الزيئاتين و $2iP$ في كالوسات الدخان التي انتخبت لقدرتها على النمو بدون الحاجة لإضافة السيتوكسينينات (Laureys et al., 1998).

٢. تكشف الأشطاء عرضياً

من المعروف أن السيتوكينينات فعالة جداً في تكوين الأشطاء سواء مباشرة على النسيج المنزوع أو المتكونة بطريقة غير مباشرة من الكالس في وجود الأوكسينات. وبالإضافة لتشجيع تكوين البراعم العرضية فإن السيتوكينينات تعمل على خفض تأثير السيادة القمية مما يؤدي إلى نشاط البراعم الجانبية. ولذا يضاف واحد أو أكثر من السيتوكينينات إلى البيئة في المرحلة الثانية من زراعة الأنسجة. وتؤدي المعاملة الناجحة في تلك المرحلة إلى تكوين عدد كبير من الأشطاء خلال ٤-٦ أسابيع (شكل رقم ٣-٩). لكن التركيزات المرتفعة تسبب تكشف عدد أكبر من الأشطاء المتقزمه وبها خلل ظاهري واضح فمثلاً قد يلاحظ تكوين ساق مفلطح به العديد من القمم الميرستيمية (شكل رقم ٣-٩). كما تتضح بها ظاهرة التميؤ الزجاجي، وغالباً تنخفض نسبة التجذير في النباتات المتكشفة في بيئة تحتوى على تركيز عالى من السيتوكينينات.

الأولى من تطورها. ولتكوين الأجنة الجسدية بزراعة الأجنة غير الناضجة لبعض سلالات القمح المعروفة بقدرتها المنخفضة على تكوين الأجنة الجسدية لوحظ أن فصل السنبال عن النبات قبل فصل المستأصل النباتي يزيد من معدل تكوين الأجنة الجسدية. وذلك لخفض المحتوى الداخلى من السيتوكينينات والذي يعتبر مصدره الجذور. وقد عزز ذلك عدم تكوين الجذور بإضافة الزياتين للمزرعة (Carman & Campbell, 1988)

٤. تثبيط تكوين الجذور

يعمل التركيز العالى نسبياً من السيتوكينينات والذي يصل إلى ٥-١٠ ملجم/لتر على تثبيط أو إعاقة تكوين ونمو الجذور. أى أنه يضاد التأثير المعروف للأوكسين على الجذور. ومن ثم يجب نقل الأشرطة المتكونة فى بيئة محتوية على السيتوكينينات إلى أخرى خالية منها لدفع الأشرطة إلى تكوين ونمو الجذور قبل نقل النباتات من المعمل. وقد يلزم النقل أكثر من مرة إلى وسط خالى من السيتوكينينات لمحو التأثير المتبقى من السيتوكينينات فى الأنسجة إذا ما كان مرتفعاً. وفى حالات نادرة استعملت تركيزات منخفضة من السيتوكينينات لتكوين الجذور. فقد وجد (Soh et al. 1998) أن كالوس نباتات *Vigna unguiculata* التى لم تكون جذور فى بيئة تحتوى على الأوكسينات فقط، كونت جذور عند زراعتها فى بيئة تحتوى على السيتوكينينات، لكن تكتشف الجذور مباشرة من الأوراق التى زرعت فى البيئة المحتوية على الأوكسين. وقد تكونت أشرطة وجذور عرضية بكثافة عالية بعد ثلاثة شهور من زراعة العقد الساقية للتين فى بيئة MS تحتوى على ٠.٥ ملجم/لتر من BA فقط (شكل رقم ٣-١٠). كما تطلب تكوين الجذور على العقل الساقية لأحد اصناف الورد المنزرعة معملياً إضافة ١ ملجم/لتر من الهرمون السابق بالإضافة إلى IBA ويمكن تفسير هذا التباين الكبير فى ضوء اختلاف التراكيب الوراثية.

شكل ٨-٣: انقسام الخلايا وتكوين الكالس على قواعد العقد الساقية لنباتات الطماطم ونمو الجنود العرضية، و الزيادة الواضحة في حجم الأوراق عند الزراعة في بيئة محتوية على أوكسينات فقط أما على اليسار فتكون حجم أقل من كالس منضغط أخضر اللون وتكشفت الأشطاء العرضية باستعمال السيوكينينات (أ). على اليمين تكشف الكالس على قواعد العقد الساقية لنبات *Rosa graveolens* عند وجود الأوكسين فقط في البيئة وعلى اليسار تكشف الأشطاء العرضية في وجود السيوكينين فقط (ب).



٣. تكوين الأجنة الجسدية Somatic embryos

يلزم إضافة السيوكينينات إلى البيئة لإنتاج الكالس الذي يتميز بالقدرة على إنتاج الأجنة الجسدية بالذات في النباتات عريضة الأوراق. لكن هناك بعض الملاحظات التي تؤكد أن السيوكينينات تثبط تكوين الأجنة الجسدية في بعض النباتات الثنائية، وقد يرجع ذلك إلى ارتفاع المحتوى الداخلي من السيوكينينات (Razdan, 2002). وقد يكون عدم تكوين الأجنة الجسدية في بعض الطرز الوراثية راجعاً لذات السبب.

وقد وجد (Tokuji & Kuriyama, 2003) أن مضادات السيوكينين تثبط تكوين الأجنة الجسدية في كالوسات الجزر وبإضافة السيوكينينات إلى البيئة تكونت الأجنة مرة أخرى، وقد لعب حامض الجبريليك دوراً مساعداً للسيوكينين في المراحل



شكل ٩-٣: التكتشف العرضي للأشطاء على القمة النامية للنخيل (أ) ومرحلة متقدمة من التكتشف (ب)، وعلى أوراق نبات السذب *Ruta graveolens* عقب شهر من الزراعة في بيئة MS مع إضافة ٢ ملجم/لتر من BA (ج)، والمزرعة بعد النمو لمدة ٤٥ يوم في بيئة سائلة (د)، لاحظ نمو الساق المفلطح في القرنفل *Dianthus caryophyllus* بسبب التركيز العالي من السيتوكينينات (هـ).

إلى أكثر من ٢ ملجم/لتر، وكانت أفضل درجة حرارة للنمو والتكشف هي ٢١°م (Fonnesbech *et al.*, 1979).

مضادات السيٹوكينينات

بعض المركبات التي تتشابه في تركيبها مع RNA مثل Octopamine, Tyraminen, Dopamine من الممكن أن تضاد عمل السيٹوكينينات وتثبط انقسام الخلايا وقد تؤدي إلى موتها لتأثيرها السلبي على آلية الانقسام الخلوي. وعلى الرغم من ذلك فإنها لا تضاد عمل السيٹوكينينات في بعض العمليات الفسيولوجية الأخرى كاستحداث نمو البراعم الجانبية أو تكشف البراعم من الكالس. كذلك فإن بعض المركبات التي تضاد فعل السيٹوكينينات في منع نمو كالوس الدخان تشجع نمو البراعم عند إضافتها مع الأوكسينات، واستنتج من ذلك احتمالية وجود مستقبلات مختلفة للسيٹوكينينات. ومن المواد التي استعملت في بعض مزارع الأنسجة مركبات imidazole وهي من المبيدات الفطرية، وأظهرت تأثيرات فسيولوجية ومورفولوجية بعضها مشابهة للسيٹوكينينات حيث أدت إلى زيادة عدد البراعم المتكشفة. لكن استعمل Toponyanont & Debergh (2001) مركب imazalil (IAM) كمضادات للسيٹوكينينات في التغلب على بعض المشاكل مثل زيادة التفرع في بعض أصناف *Gerbera jamesonii* أثناء الإكثار الدقيق حيث يلاحظ وجود عدد من القمم النامية المرتبة في وضع خطي في قمة ساق متضخم مع توزيع غير طبيعي للأوراق، وهي من الظواهر غير المرغوبة في الإكثار الدقيق لبعض النباتات.

ورغم أن هذا المركب لا يتبع مجموعة معوقات النمو المعروفة باسم triazoles إلا أنه يشابهها في التركيب البنائي ويؤثر على بعض الإنزيمات التي تشارك في تصنيع المركبات التربينيه وبالتالي يعيق تصنيع بعض منظمات النمو مثل حامض الجبريك (GA_3) والأبسيسك (ABA) بالإضافة إلى الاستيرول والسيٹوكينينات. وأدى استعمال

وتتوقف التأثيرات الفسيولوجية السابق ذكرها للسيتوكينينات في زراعة الأنسجة على درجة حرارة المزرعة. فدرجة الحرارة العالية نسبياً تؤدي إلى خفض فاعلية السيتوكينينات لكنها قد تشجع فعل الأوكسينات. ففي البيجونيا شجعت السيتوكينينات تكوين الأفرع عند درجة حرارة ٢٧°م أما عند خفض الحرارة إلى ١٥°م فإن نفس التركيز لا يسبب تكوين الأشطاء. كذلك في بيئة MS كان النمو وتكوين الأفرع الجانبية من القمم النامية لنبات الأسبرجس الناعم *Asparagus plumosus* أسرع على درجة



شكل ٣-١٠: الكشف العرضي للأشطاء والجذور في بيئة MS تحتوى على ١ ملجم/لتر من BA.

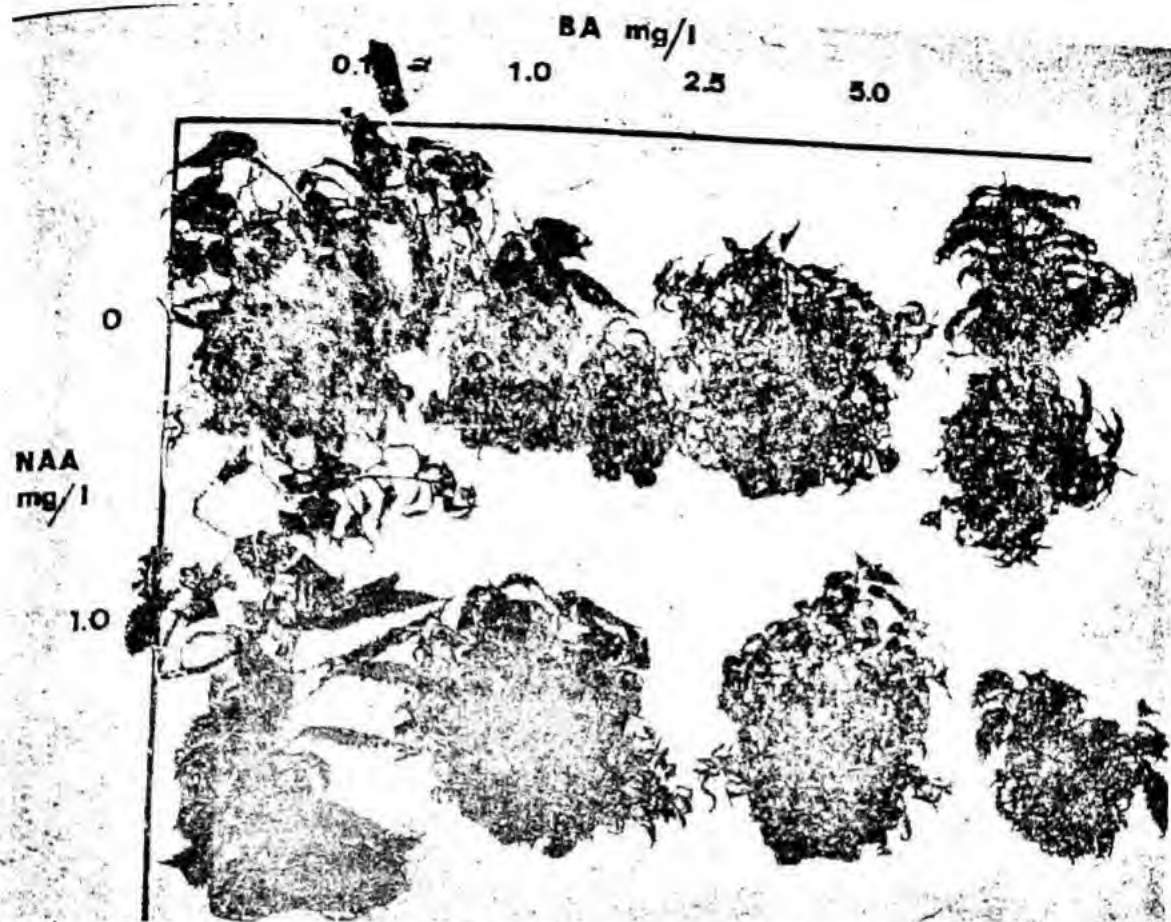
حرارة ٢٤°م لكنها توقفت عن النمو بعد ٤ أسابيع. وكان النمو أبطأ لكنه مستمر عند حفظ المزرعة على درجة ١٧°م. وتوقف النمو عند حفظ المزرعة على درجات حرارة ٩°م أو ٣٠°م. كما زاد التركيز اللازم لدفع تكوين الأشطاء من BAP بزيادة درجة الحرارة، فعند ١٧°م كان أفضل تركيز لتكوين الأشطاء هو ٠.٠٢ ملجم/لتر وارتفاع درجة الحرارة إلى ٢١°م كان التركيز الأفضل ٠.٢-٢ ملجم/لتر وعند ٢٤°م تطلب الأمر رفع التركيز

هذا المركب إلى انخفاض معدل تكشف الأَشْطَاء لكن قلت ظاهرة زيادة معدل التفريع اعتماداً على التركيز المستعمل ومصدر النسيج المنزرع. وتشير النتائج إلى أن التركيزات المنخفضة الأقل من ١٢.٥ ميكرومول لم تؤثر على معدل تكشف الأَشْطَاء في حين أن التركيز المرتفع الأعلى من ٢٥ ميكرومول قلل معدل تكشف الأَشْطَاء حيث مات بعضها في مرحلة مبكرة، وكانت الأَشْطَاء الباقية متقرمة لكنها عاودت النمو عند نقلها إلى بيئة خالية من IAA وأنتجت نبيتات عادية.

التداخل بين الأوكسينات والسيبتوكينينات

أصبح من المعروف أن النسبة بين الأوكسينات والسيبتوكينينات المضافة إلى بيئة النمو من أهم العوامل المحددة للنمو والتكشف مع الأخذ في الاعتبار التركيز الداخلي لهما. وكانت بداية تلك الملاحظات عندما وجد Skoog & Millar في سنة ١٩٥٧ أن كالوس نبات الدخان تتكشف منه الأَشْطَاء عند إضافة تركيز منخفض من الأوكسينات مع زيادة نسبية في تركيز السيبتوكينينات وإذا كان العكس فإن الكالس لا يتكشف في أغلب الحالات، ويوضح شكل رقم (٣-١١) تأثير التداخل بين الأوكسينات والسيبتوكينينات على زراعة أنسجة نبات *Amelanchier laevis*.

وتوالت الأبحاث التي تشير إلى مدى أهمية تركيز الأوكسينات والسيبتوكينينات في عمليات النمو والتكشف في زراعة الأنسجة. وغالباً تضاد السيبتوكينينات فعل الأوكسينات وبالطبع فإن ذلك يتأثر بالنوع النباتي (شكل رقم ٣-١٢) وعدد من العوامل الأخرى المتعلقة بالنسيج بالإضافة إلى الظروف البيئية. ويرجع ذلك إلى أن الاتزان بين المجموعتين ضروري جداً في تكوين المنشآت الميرستيمية للجذور والأَشْطَاء. كما يتم تنظيم انقسام الخلية بالاتزان بين المجموعتين والتداخل بينهما فكل منهما يؤثر في مرحلة معينة من الانقسام فالأوكسين له دور في تضاعف الـ DNA أى استحثاث دورة الخلية بينما تلعب السيبتوكينينات دوراً في التحكم في عمليات الانقسام الميتوزي للخلية



شكل ٣-١: تأثير تركيز والنسبة بين BA و NAA على استجابة الأجزاء المنزرعة من أوراق نبات *Amelanchier laevis*.

(Pasternak et al., 2000). فعلى سبيل المثال يؤدي التضاعف المتأخر لـ DNA إلى زيادة معدل الطفرات والتغيرات الوراثية. ويعتقد أن الخلية لا تدخل في الانقسام الميتوزي إلا في وجود السيٲوكينينات بينما نمو الكالس والمعلق الخلوي يمكن أن يتم في وجود الأوكسينات فقط. ومعظم أبحاث زراعة الأنسجة تهتم بحساب التركيز الأمثل والنوع المستخدم من كلا المجموعتين باعتباره حجر الأساس لعمليات الكشف ونمو وتطور الأشطاء. وتوضح نتائج Nakano et al. (1999) المبينة في جدول رقم (٣-٣) أثر استخدام NAA و BA بتركيزات مختلفة على كشف البراعم العرضية ونمو الأشطاء في مزرعة أنسجة أوراق نباتات *Begonia tuberhybrida*.



شكل ١٢-٣: استجابة أوراق ثلاث طرز وراثية من الطماطم للزراعة في بيئة تحتوي على ٠.٥ ملجم/لتر من IAA و ٢ ملجم/لتر من BA.

جدول ٣-٣: تأثير تركيز NAA و BA على تكشف البراعم ونمو الأقطاء من أنسجة أوراق نباتات *Begonia tuberhybrida* كما وجدها Nakano et al. (1999).

عدد الأقطاء للجزء المنزرع ١٠ مم/جزء المنزرع	عدد الأقطاء/ للجزء المنزرع	الأجزاء المتكشفة %	BA ميكرومول	NAA ميكرومول
٠.٠	٠.٠	٠	٠.٠٠٠	٠.٠٠٠
٠.٣	٠.٣	١٣	٠.٤٤٤	٠.٠٠٠
٠.٦	٠.٨	٢٦	٠.٤٤٤	٠.٠٠٠
٠.٣	١.٣	٢٣	٠.٤٤٤	٠.٠٠٠
٠.٠	٠.٠	٠	٠.٠٠٠	٠.٥٤٠
٩.١	١٢.١	١٠٠	٠.٤٤٤	٠.٥٤٠
٤.٤	٢٢.٤	١٠٠	٠.٤٤٤	٠.٥٤٠
٠.٧	١٨.٦	٥٦	٠.٤٤٤	٠.٥٤٠
٠.٠	٠.٠	٠	٠.٠٠٠	٥.٤٠
٦.٧	١١.٩	٧٨	٠.٤٤٤	٥.٤٠
٣.٥	٢٠.١	١٠٠	٠.٤٤٤	٥.٤٠
٢.٩	٢٥.٩	١٠٠	٠.٤٤٤	٥.٤٠

ولدراسة تأثير التداخل بين الأوكسينات والسيتوكينينات على تكوين ونمو الكالس وتكشف الأعضاء من عدة أجزاء نباتية من سلالات تابعة لنباتات *Amaranthus hypochondriacus* وهي *A. hybridus* و *A. caudatus* و *A. cruentus* قام Bennici et al. (1997) باستعمال بيئة MS تحتوى على تركيزات مختلفة من NAA و BA أو 2iP أو الكينيتين كما هو مبين فى الجدولين رقم (٣-٤ و ٣-٥) واتضح أن جميع نباتات السلالات المختبرة لها قدرة على تكوين الكالس لكن مع وجود تفاوت بين السلالات المختلفة. إلا أن هذه القدرة المقاسة على أساس الوزن الجاف للكالوس تتوقف على نوع وتركيز ونسب منظمات النمو المضافة. ويلاحظ أيضاً من الجدولين أن تأثير التداخل بين NAA و BA أو 2iP أو الكينيتين وبتراكيز مختلفة امتد إلى مقدرة الكالس المتكون على الكشف فى بعض البينات تكونت جذور أو اشطاء فقط وفى بينات أخرى تكونت اشطاء وجذور على نفس الكالس، بينما لم تظهر الأجزاء المنزرعة فى بعض البينات أى استجابة. وبصورة عامة يمكن توضيح الاستجابات المتوقعة عند تغيير نسبة كل من الأوكسينات والسيتوكينينات فى بيئة النمو فى الشكل رقم (٣-١٣). لكن يجب ملاحظة أن النتائج فى كثير من الأحيان لا تتطابق مع المتوقع فعلى سبيل المثال:

١. تكوين الأشطاء فى النباتات عريضة الأوراق يحتاج أحيانا إلى وجود الأوكسينات والسيتوكينينات بنفس التركيز.
٢. أنسجة النباتات وحيدة الفلقة تكون الكالس فى وجود تركيز عالى من كلا المنظمين وقد يكون وجود السيتوكينينات ضرورى أو غير ضرورى.
٣. الكشف فى كالوس النباتات وحيدة الفلقة يشجع غالباً بالنقل إلى وسط خالى من الأوكسينات أو على الأقل بخفض تركيزها أو استعمال أكسينات أقل نشاطاً مثل IAA. ويرجع ذلك إلى أن طبيعة التداخل بين المجموعتين وتأثير الظروف البيئية معقدة جداً.

ومن ثم ممكن الحصول على أكثر من توليفة من التركيزات لها نفس التأثير الوظيفى فى مزارع الأنسجة، ويمكن الحصول على نفس النتائج فى وجود كلا المنظمين

معا بوضع النسيج في وسط محتوى على أحد المنظمين ثم نقله إلى وسط يحتوى على المنظم الآخر.

جدول ٣-٤: تأثير بعض منظمات النمو (ميكرومول) على الوزن الجاف للكالس (ملحم) لنباتات *A. hybridus* و *A. hypochondriac* و *Amaranthus cruentus* بعد شهر من الزراعة (Bennici et al., 1997).

السلالة والنوع		2,4-D 2.3 + Kin 2.3	NAA 5.4 + BA 4.4	NAA 5.4 + BA 13.3
<i>A. caudatus</i>	PI490458	٢٧	٣٥	١٦
	AMES15114	٢٧	٢٣	١٦
	AMES5461	٥	١.٥	١.٥
المتوسط		٢٣	٢٠	١١
<i>A. cruentus</i>	434	٦١	١٦٥	١٤٦
	622	٢١	٤٤	٥٥
	AMES2248	٣٦	٤٨	٦٨
	AMES2247	٧٣	٢٩	٦٢
	PI511731	٣٧	٦٤	٣٠
	PI477913	٥٠	١٠٩	١٢٦
المتوسط		٤٦	٧٧	٨٦
<i>A.</i>	1122	١٧	١٠	٨٥
	781	٢٣	٨٥	١٩
	467	١١	٦٦	٣٩
	722	٢٢	٧٤	٥٩
	412	٣٤	٢٤	٣٣
	PI540446	٤٢	٤٥	٨٤
المتوسط		٢٥	٥١	٤٨

جدول ٥-٣: تأثير منظمات النمو (ميكرومول) على تكوين الكالس C والأشطاء S والجنور R لسلالات من *Amaranthus cruentus*, *A. hybridus* و *A. hypochondriacus*. بعد شهر من الزراعة (Bennici et al. 1997).

النوع سلالة/	NAA 2.7 + 2iP 2.5		NAA 2.7 + Ki2.3		NAA 0.5 + BA0.4		NAA 2.7 + BA 4.4		NAA 5.4 + BA13.3		NAA 0.5 + BA 4.4	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
<i>A. cruentus</i>												
434	١٠٠	٤٥	١٠٠	٣٧	-	-	-	-	-	-	-	-
				٧٠(R)								
1034	-	-	-	-	٧٠	١٠٠	٩٢	٥٤	١٠٠	٤٥	٨٠	-
												٤٧(R)
<i>A. hybridus</i>												
	١٠٠	١١	١٠٠	-	١٠٠	١٥	١٠٠	-	٦٢	-	١٠٠	٨
<i>A. hypochondriacus</i>												
674	١٠٠	١٣	١٠٠	١٠	-	-	-	-	-	-	-	-
				٨٠(R)								
1221	١٠٠	٥٠	١٠٠	١٠٠(R)	-	-	-	-	-	-	-	-

ثالثاً: الجبريلينات Gibberellins

تعتبر الجبريلينات أحد الهرمونات الطبيعية المخلقة داخل أنسجة النباتات الراقية والدنيئة على حد سواء. وتتركز مناطق تجهيزها في النباتات الراقية في الأوراق حديثة التكوين كما تخلق كميات قليلة منها في الجذور. وقد عزل العديد من أنواع الجبريلينات وتم تسميتها بأرقام تضاف إلى الاختصار GA وذلك حسب ترتيب اكتشافها. وتتفق جميع



شكل ٣-١٣: الاستجابات المختلفة للتركيز النسبي لكل من الأوكسينات والسيتوكينينات في زراعة الأنسجة

هذه المركبات بأنها مركبات عضوية تحتوى على حلقة Gibban وتخلق من التربينات الثنائية. وتحتوى الأنواع النباتية المختلفة على أنواع مختلفة من الجبريلينات، لكن ليس لكل الجبريلينات نشاط فسيولوجى فى كل الاختبارات الحيوية. ويعتمد نشاطها الوظيفى على قدرتها على الحركة والانتقال داخل النسيج أو تحويلها إلى مركبات أخرى تكون أكثر نشاطا من الناحية البيولوجية. وقد تم التعرف على بعض المركبات الحرة الوسطية اللازمة لتصنيع الجبريلينات والتي لها نشاط بيولوجى مشابه لها. ورغم تعدد أنواع الجبريلينات المكتشفة إلا أن المستحضرات التجارية المستخدمة تكون إما حامض الجبريليك GA_3 فقط (شكل رقم ٣-١٤) أو خليط من النوعين GA_4 و GA_7 . وحيث أن تصنيع الجبريلينات فى الأنسجة النباتية عموماً يمكن أن يثبط بعدد من المركبات

المعروفة بمعوقات النمو، فإن إضافة تلك المركبات إلى مزارع الأنسجة يؤثر على النمو والتكشف.

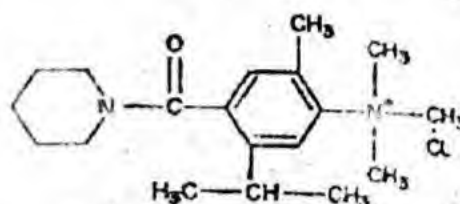
من المعروف ان للجبريلينات تأثيرات واضحة في النمو والتكشف وينعكس ذلك على الشكل المورفولوجي للنباتات الكاملة. ومن هذه التأثيرات استطالة السوق، تشجيع الأزهار، عقد الثمار ومعظم هذه العمليات تتم عبر التحكم في التصنيع الحيوي لعدد من الإنزيمات. وقد أوضح (Francis & Sorrell 2001) أن حقيقة استطالة الخلايا عند المعاملة بالجبريلينات لم تكن كاستجابة مباشرة لها لكن لدورها في رفع مستوى الأوكسين الداخلي بتحويل الأوكسينات المرتبطة إلى أكسينات حرة ومنع أكسدة الأوكسينات بفعل إنزيم بيروكسيداز اندول حامض الخليك وإعاقة إنزيمات الأكسدة عموماً بزيادة تصنيع الفينولات الحرة. ويعتقد أن استطالة الخلايا نتيجة المعاملة بالجبريلينات تقود إلى انقسام الخلايا في مرحلة لاحقة حيث يحدث تنشيط لانقسام الخلية في المرحلة G2 من دورة الخلية في القمم الميرستيمية لبعض النباتات. ومن النظريات التي تفسر استطالة الخلايا عند معاملة الجبريلينات زيادة إمتصاص البوتاسيوم وتأثير ذلك على الضغط الاسموزي للخلية. كذلك تلعب الجبريلينات دوراً على المستوى الجيني بزيادة تصنيع RNA وتصنيع بعض الإنزيمات وبالذات تلك المصاحبة للإنبات في حبوب النجيليات.

دور الجبريلينات في زراعة الأنسجة

ليس من الشائع استعمال الجبريلينات في مزارع الأنسجة لكنها تضاف أحياناً لبعض المزارع لإحداث التأثيرات التالية:

١. تكوين الكالس والتكشف

غالباً يحدث النمو والتكشف في مزارع الأنسجة دون إضافة الجبريلينات، لكن قد يمثل وجودها أهمية في حالة زراعة الخلايا بكثافة منخفضة. وعند إضافتها للبيئة خاصة بتركيزات عالية نسبياً تتراوح بين ١ : ٨ ملجم / لتر تحدث تأثيرات مشابهة



Ammonium (5-hydroxycarvacryl)
trimethylchloride piperidine
carboxylate : "AMO1618"

۱۷۲

أشار البعض إلى التأثير المشجع للتركيزات المنخفضة (1.0×10^{-3} ملجم/لتر) من GA_3 في تكوين الأجنة الجسدية لكن غالباً تمنع إضافة الجبريلينات إلى مزارع تكشف الأجنة الجسدية (Cheong & Pooler, 2004). ومن ثم تؤدي إضافة مثبطات التخليق الحيوي للجبريلينات إلى زيادة عدد الأجنة المتكونة، وقد سجل ذلك بالفعل في مزارع أنسجة بعض أنواع الموالح (Spiegel-Roy & Saad, 1986). لكن كان لمركب Paclobutrazol المعروف بتثبيطه التصنيع الحيوي للجبريلينات تأثيراً قليلاً على عدد الأجنة الجسدية في بعض الأنواع النباتية. ولوحظ ارتفاع مستوى الجبريلينات في الخلايا غير المتكشفة لسلاسل نبات الجزر التي لا تكون أجنة جسدية، والأجنة الجسدية حديثة الكشف تحتوي على تركيز منخفض من الجبريلينات لحدوث هدم سريع لها. وسجل Emons *et al.* (1993) تأثير مضاد للجبريلين على الفعل المنشط لهرمون ABA في اكتمال تطور الأجنة الجسدية للذرة.

٢. تكوين الجذور

تثبيط معاملة قواعد العقل بتركيز مرتفع نسبياً من الجبريلينات تكوين الجذور حتى لو تم إضافة الأوكسينات في نفس الوقت. وكذلك فإن إضافة الجبريلينات إلى مزارع الأنسجة تمنع غالباً تكشف الجذور العرضية على الأشطاء المتكونة. لكن تمكن Tang (1999) & Fan من استحثاث تكوين الجذور العرضية على كالوسات *Pinus taeda* باستعمال خليط من GA_3 و BA بالإضافة إلى IBA. وبالرغم من ذلك أشار بعض الباحثين إلى تشجيع تكوين الجذور العرضية باستعمال الجبريلينات، لكن فسر ذلك على أساس زيادة مستوى IAA الداخلي كنتيجة للمعاملة بالـ GA_3 .

٣. نمو وتطور الأعضاء

بالرغم من أن الجبريلينات تمنع تكوين المنشآت الميرستيمية الأولية في الكالس والتي تكون الجذور والأشطاء لاحقاً إلا أنها قد تكون ضرورية لتدعيم النمو والتطور

فى الأعضاء المتكونة. ولإن GA_3 يشجع نمو الأشطاء فى مزارع العقد الساقية فإنه يضاف للبيئة فى المرحلة الأولى والثانية من زراعة الأنسجة. وقد ثبتت فاعلية الجبريلينات أحيانا بدرجة أعلى من الأوكسينات فى هاتين المرحلتين. وتضاف الجبريلينات بتركيز منخفض (٠.٠٣-٠.١ ملجم/لتر) إلى مزارع القمم الميرستيمية لتحسين النمو. وكان لإضافة GA_3 بتركيز ٠.١ ملجم/لتر إلى بيئة إكثار بعض أصناف الورد أهمية فى كشف الأشطاء وزيادة معدلها كذلك لنمو النباتات عقب ذلك. ويجب التنويه إلى أهمية نقل الأشطاء بعد ذلك إلى وسط خالى من الجبريلينات مع إضافة الأوكسينات لدفعها للتجذير (Nikbakht et al., 2005).

ومن الاستخدامات الأخرى للجبريلينات فى زراعة الأنسجة التغلب على بعض المشاكل الناتجة عن استعمال السيٲوكينينات ففى الفراولة يلاحظ أن استعمال السيٲوكينينات يسبب نمو سيقان مفلطحة لها أكثر من قمة نامية وتعرف هذه الظاهرة بـ *Apical integrity* وهى غير مفضلة من الناحية الإنتاجية. وبإضافة GA_3 إلى بيئة النمو أمكن تصحيح هذا التغيير المورفولوجى. كذلك كانت الجبريلينات بتركيزات ٠.٥ و ٠.٣٥ ملجم/لتر مفيدة فى التغلب على تقزم السيقان لمزارع *Ficus benjamina* و *Acacia sinuata* بسبب زيادة تركيز السيٲوكينينات فى البيئة المستعملة للتضاعف (Delamomarco & Picazo, 1994; Vengadesan et al., 2000, 2003). كذلك تضاف الجبريلينات للتغلب على مشكلة السكون التى تتعرض لها النباتات خاصة الأشجار عقب نقلها إلى التربة وقبل نقلها إلى خارج المعمل كبديل للمعاملة بالبرودة فمن المعروف أن البرودة تشجع التصنيع الحيوى للجبريلينات. كذلك فإن المعاملة بالبرودة مهمة لدفع تكوين البرعم الزهرى فى التيوليب ومن الممكن أن تحل المعاملة بـ GA_3 بتركيز ١ ملجم/لتر فى بيئة النمو محل البرودة.

مضادات حامض الجبريك ومعوقات النمو والتطور

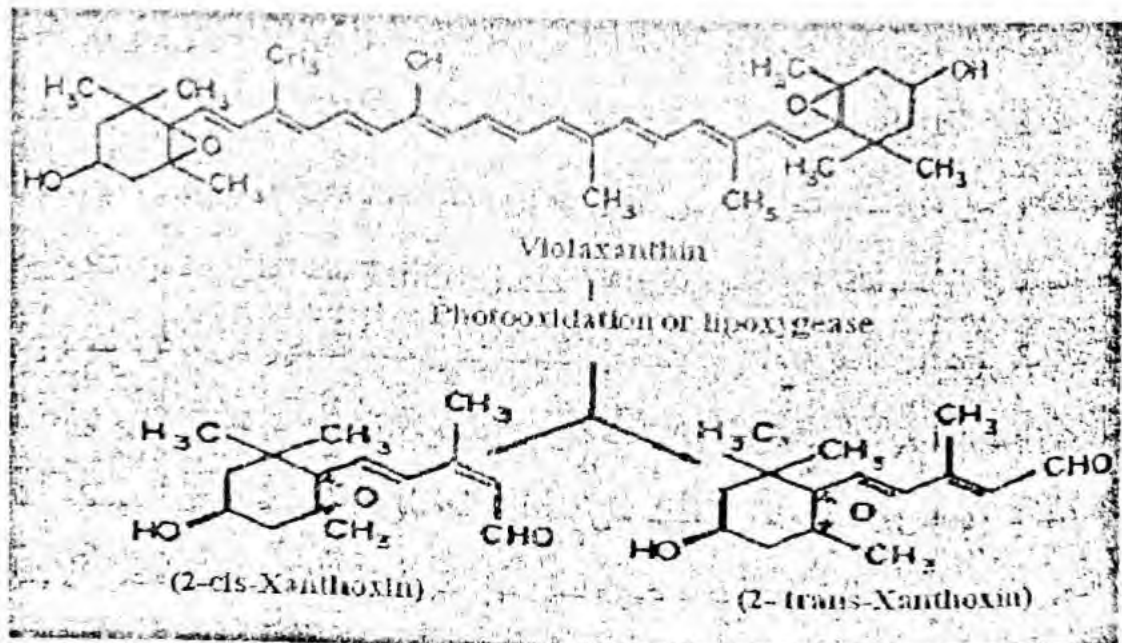
كما سبق القول غالباً تثبط الجبريلينات النمو في مزارع الأنسجة، وربما تشجع بعض المواد التي تعيق التصنيع الحيوى للجبريلينات نمو النباتات التي تمتاز بإرتفاع محتواها الداخلى من الجبريلينات. وبعض هذه المواد ينعكس أثرها بإضافة GA_3 ومن هذه المركبات السيكوسيل CCC; 2-chloroethyl)trimethylammonium chloride (Cycocel; Chlormequat) ومركب Ammonium 5-hydroxycarvacryl) وكذلك trimethylchloride piperidine carboxylate (AMO1618) و $2,4-D$ ومركب Diclorobenzyltributyl phosphonium chloride "Phosfone -D" ومن هذه المجموعة أيضاً مركب Daminozid لكنه أقل تأثيراً. يشجع CCC و Ancymidol تكوين الأجنة الجسدية في الموالح والتي تثبط بـ GA_3 . وعند إضافة مضاد التخليق الحيوى للجبريلين المعروف بـ Ancymidol إلى بيئة النمو المحتوية على NAA والكينيتين قل معدل تكوين الكالس في قواعد العقل وحد كذلك من ظاهرة السيادة القمية، وزاد معدل تكوين الجذور والأشطاء ونمو تلك الأعضاء بصورة عامة من العقد الساقية لنبات *Callistephus*. كما تشجع مثبطات الجبريلين تكوين الأبصال في مزارع الأنسجة. وفي الطماطم لم تشجع إضافة CCC إلى بيئة النمو تكشف البراعم لكن معاملة النبات الأصل بمحلول CCC قبل اخذ الجزء النباتى كان له تأثيراً واضحاً في كشف البراعم.

ومن المركبات الأخرى التي ثبت أنها تضاد عمل GA_3 وتشجع تكوين الأجنة الجسدية في مزارع الأنسجة، المركبات العضوية المحتوية على حلقة Triazol مثل Paclobutrazol وهي فعالة جداً في منع تكوين GA_3 كما تعيق أيضاً تصنيع Sterol وحامض الابسيسك ABA. وقد شجع مركب Paclobutrazol تكوين الجذور العرضية في عدد من النباتات. وبمعاملة النباتات المستولدة معملياً بمعوقات تخليق الجبريلين

المشار إليها تمكن (Panaia et al. 2000) من رفع نسبة نباتات *Symonanthusbancroftii* التي أمكن أقلمتها.

رابعاً: حامض الأبسيسيك Abscicic acid

يوجد حامض الأبسيسيك ABA والموضح بشكل رقم (١٥-٣) طبيعياً في معظم أفراد المملكة النباتية في صورة حرة أو مرتبطة مع مركبات أخرى. ويتم تصنيعه الحيوى داخل الكلوروبلاست الموجود بطبقة الميزوفيل للأوراق النباتية من حامض الميفالونك أو من مركب الفيولازانثين الذى يعتبر أحد الصبغات الكاروتينية في النباتات. ويوجد حامض الأبسيسيك في صورتين هما cis و trans وذلك على أساس مكان وجود مجموعة الكربوكسيل الطرفية، وقد يحتوى النبات على كلتا الصورتين. لكن الصورة cis هي الأكثر شيوعاً في الطبيعة، ومن الممكن أن تتحول الصورة trans إلى cis داخلياً أثناء عمليات الأيض. كما يوجد العديد من المواد العضوية المنتشرة في المملكة النباتية ذات التأثير المشابه في النشاط البيولوجى وليس في التركيب الكيميائى لحامض الأبسيسيك (Davies, 2004).



شكل ١٥-٣: التركيب الكيميائى والتخليق الحيوى لحامض الأبسيسيك

وغالباً يصنف حامض الأبسيسيك كمثبط للنمو لأنه يتحكم جزئياً في سكون البذور والبراعم، وربما يرجع تأثيره إلى تثبيط فعل الأوكسين في استطالة الخلايا بزيادة درجة حموضة الخلايا ومطاطية جدرانها. ومن المعروف الآن أن هناك تنافس بين حامض الأبسيسيك والجبريلينات على نفس مكان الارتباط في الخلية. كذلك يمنع هذا الحامض تصنيع الجبريلينات داخل النبات ويزيد من تحويل الجبريلينات الحرة إلى مرتبطة وغير نشطة بيولوجياً. كما ثبت أن لحامض الأبسيسيك تأثيراً إيجابياً على تصنيع ونشاط السيٲوكينينات في النباتات الكاملة. ورغم ذلك فسر تشجيعه لتكوين الكالس أحياناً بدوره في الحد من النشاط الزائد للسيٲوكينينات. ولحامض الأبسيسيك عدة تأثيرات فسيولوجية تنظيمية أخرى مثل فتح الثغور، إمتصاص الجذور للماء والأيونات، شيخوخة الأوراق.

يمتص حامض الأبسيسيك كجزء كامل ويؤدي ذلك إلى زيادة حموضة الجدر الخلوية. وغالباً يثبط تكوين الكالس بحامض الأبسيسيك لكن في بعض التجارب وجد أن التركيزات المنخفضة في مدى ٠.٠٥-٢.٦ ملجم/لتر مشجعة لتكوين الكالس. ويشجع حامض الأبسيسيك عمليات التكشف في بعض النباتات، وكانت أول ملاحظة لذلك هي زيادة معدل تكوين البراعم العرضية على أوراق البيجونيا عند زراعتها في تربة عادية وانعكس هذا التأثير عند المعاملة بالأوكسين أو حامض الجبريليك. وقد ارتبط هذا التأثير بميعاد المعاملة، بمعنى أن الفصول المختلفة في السنة تؤثر على المحتوى الداخلي من حامض الأبسيسيك مما يؤثر في النهاية على مدى الاستجابة للإضافة الخارجية. وبناء على هذا قد يستعمل الحامض لدفع المُستأصل لتكوين كالوس وتكشف الأعضاء منه (Jimenez & Bangerth, 2001) مع ملاحظة أن هذه التركيزات المنخفضة تسبب نقص في الوزن الجاف للكالوس وقد تسبب التركيزات المرتفعة إلى وقف التكشف، لكن يعتمد ذلك على النوع النباتي والنسيج المستعمل. وقد يشجع الحامض تكشف الأزهار على النباتات المستولدة في مزارع الأنسجة وقد لاحظ ذلك Tanimoto et al. (1985) عند

إضافة ١٠٠ ملجم/لتر منه إلى بيئة زراعة نباتات *Torenia*. وكان أعلى معدل لتكوين الأزهار عندما تراوح محتوى الأنسجة من الحامض والذي يتوقف على الكمية المضافة خارجياً وتلك الموجودة طبيعياً في النسيج بين ١٦-٢٠ ملجم/جم. وبعض الأبحاث مثل (Hartung & Abou-Mandour, 1996) تشير إلى دور إضافة ٢.٥ ملجم/لتر من حامض الأبسيسك في تشجيع الجذور الجانبية والشعيرات الجذرية لنباتات *Ruta graveolens* مما يرفع نسبة الأقامة وربما يرجع ذلك إلى تأثيره كمضاد للفينولات.

أوضح (Moshkove et al., 2008) أن للتركيزات المنخفضة من حامض الأبسيسك دور هام في التطور الطبيعي وإنضاج الأجنة الجسدية للعديد من الأنواع النباتية. كما قد يعزى تكوين الأجنة غير عادية التكوين وكذلك الأجنة المساعدة التي تتكون على محور الجنين الأصلي وعاقة تطور الأجنة الجسدية لتركيز حامض الأبسيسك. ومن ثم يجب أن يحدد المستوى الداخلى مقدار التركيز الخارجى اللازم إضافته وفى الغالب يضاف حامض الأبسيسك بتركيز ٠.٠٢-١ ملجم/لتر. وقد استعمل بتركيز ٧.٥ ملجم/لتر لتكوين الأجنة الجسدية مباشرة من بذور أحد أصناف الشاي خلال أسبوعين فقط من الزراعة ويرتبط تأثير حامض الأبسيسك فى إنتاج الأجنة الجسدية بوجود IAA الداخلى، وفى غيابه لا يدفع حامض الأبسيسك الخلايا لتكوين الأجنة الجسدية. وقد سجلت زيادة فى مستوى IAA الداخلى بمعاملة الأجنة الجنسية غير الناضجة لبذور نباتات *Helianthus annuus* بحامض الأبسيسك وتكونت منها أجنة جنسية وليس كالوس، أى أن الحامض يعمل على تحويل تركيز الهرمونات الأخرى داخل النسيج (Charriere et al., 1999). وقد أمكن باستعمال الهندسة الوراثية والطفرات الحصول على نباتات *Nicotiana plumbaginifolia* مستواها الداخلى من حامض الأبسيسك منخفض. وبزراعة هذه الأنسجة معملياً حدثت إعاقة لتكوين الأجنة الجسدية فى طور ما قبل الكروى pre-globular وبإضافة حامض الأبسيسك إلى البيئة تكونت الأجنة (Feher et al., 2003). ويوضح (Dodeman et al., 1997) بعد دراسة الطفرات التي

لا تخلق الحامض أو تلك غير الحساسة له من نباتات الارابيدوبسيس أن حامض الابسيسك يتحكم فى التعبير الجينى للجينات المنوط بها دفع الخلية لتكوين الأجنة الجسدية وكذلك البروتينات التى تخزن فى الخلية أثناء تكوين الأجنة والتى تستخدم بعد ذلك أثناء الإنبات.

خامساً: غاز الإثيلين Ethylene

الإثيلين (C_2H_4) مركب عضوى ينتج طبيعياً فى النباتات الراقية والدنية على حد سواء، ويزيد معدل تصنيعه فى الأوراق والثمار فى مرحلة الشيخوخة. ومن العوامل التى تشجع تخليقه داخل الأنسجة الجروح الميكانيكية، الإصابات الحيوية، عمليات الإجهاد البينى كالملوحة، الجفاف، بعض المعادن السامة، التقليل، سوء التخزين. ويذوب الإثيلين بمعدل ٢٢٥ سم/١٠٠ مل ماء على درجة الصفر المئوى، ويعتبر من أحد الهرمونات النباتية ذات التأثير الفعال فى بعض العمليات الحيوية رغم تركيزه القليل جداً. وتحتوى المناطق الميرستيمية والعقد الساقية الطرفية على كميات كبيرة منه بالمقارنة مع الأجزاء غير الميرستيمية والعقد الساقية القاعدية. ويلاحظ أن هذه المناطق هى التى تحتوى على تركيزات عالية من الأوكسين، أى أن هناك علاقة طردية بين تركيز الأوكسين والإثيلين. لكن وجود الإثيلين بتركيزات منخفضة قد لا تتجاوز ميكرو لتر واحد فى جو النمو يسبب نمو غير طبيعى للنبات. ويقوم الغاز بدوره الحيوى بعد ارتباطه ببعض البروتينات المحتوية على الحديد فى الخلايا النباتية. ويذوب الغاز فى طبقة الفوسفوليبيدات من الأغشية الخلوية فيزيد نفاذيتها للمواد العضوية. ويبدو أيضاً أن الإثيلين يلعب دوراً غير مباشر فى تصنيع الحامض النووى RNA والبروتين (Davies, 2004).

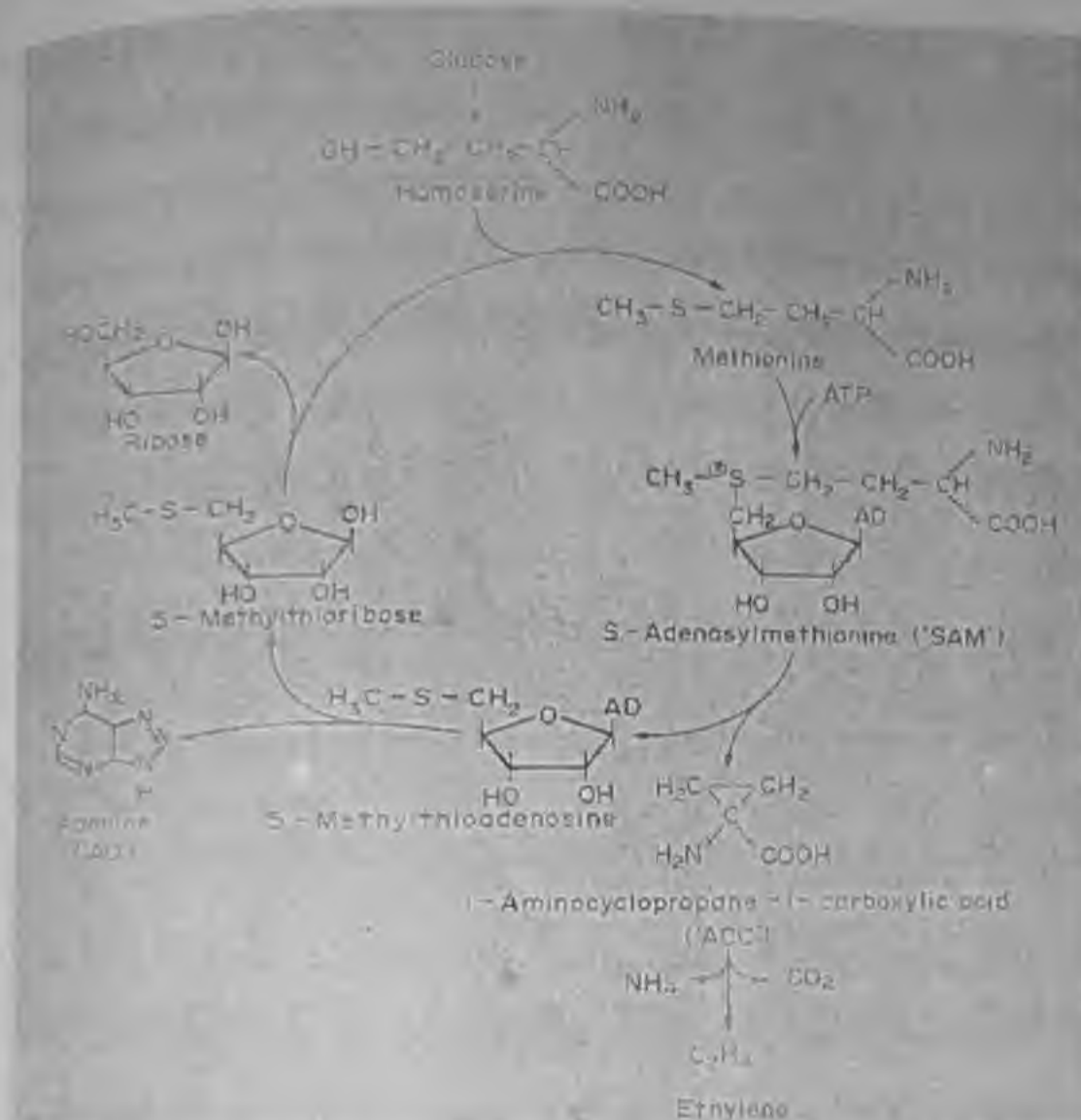
التخليق الحيوى للإثيلين ومثبطاته

يعتبر حامض الميثونين المصدر الحيوى لتخليق الإثيلين حيث تزيد إضافته إلى وسط النمو من تصنيع الإثيلين. ويوضح الشكل رقم (٣-١٦) مراحل التخليق الحيوى

الإيثيلين، ويتبين أن التصنيع يتم من خلال تخليق مركب aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC) ومن ثم تؤدي إضافة هذا المركب إلى النبات إلى زيادة تخليق الإيثيلين وبالتالي تنشيط العمليات الفسيولوجية الراجعة له. ويتوقف مستوى الإيثيلين الداخلي على وجود الإنزيمات المشتركة في تخليق ACC والأكسجين والشوارد الحرة. ولأن الميثونين يخلق من حامض الاسبارتك فإن إضافة الاسبرجين أو السستين يشجعان تخليقه. كما يحفز وجود الكربوهيدرات، الضوء، الأوكسينات، السيتوكينينات، ثاني أكسيد الكربون تحويل الميثونين إلى الإيثيلين. ومن المركبات المستعملة لتوليد الإيثيلين داخل الأنسجة النباتية مركب الإيثيفون حيث يمتص ثم يحدث له تكسير داخل الأنسجة ويتحرر إيثين في السيتوبلازم.

ويرجع تأثير المركبات التي تثبط التخليق الحيوي للإيثيلين ومنها Aminoethoxyvinylglycine (AVG) ومركب 2,5-norboranadien (NBD) وكذلك أيون الكوبلت والمواد المخيلية إلى تثبيطها فعل الإنزيمات المصنعة له. كما أن المركبات التي تثبط عمليات الأكسدة تعيق تصنيع الإيثيلين حيث تمنع تحويل ACC إلى الإيثيلين وبعض المركبات تثبط فعل الإيثيلين بارتباطها بالغاز نفسه. وتستهلك المركبات التي تثبط فعل الإيثيلين كنترات الفضة $AgNO_3$ وثيوسلفات الفضة AgS_2O_3 كبديل للمركبات التي تثبط تصنيعه لإيقاف نشاطه الوظيفي في حالة وجود تأثيرات غير مرغوبة في المزرعة. لكن يتطلب الأمر إضافة تركيز عالي يصل إلى ٥-١٠% من ثيوسلفات الفضة أو نترات الفضة لإحداث تأثير مضاد لـ ٥-٢٠ جزء في المليون من الإيثيلين.

كذلك فإن رفع تركيز ثاني أكسيد الكربون في جو المزرعة إلى ٥-١٠% يثبط الإيثيلين لإرتباطه مع مراكز ارتباط الإيثيلين بالخلية، لكنه لا يطرد الإيثيلين المرتبط سابقاً في تلك المواقع. ويعتبر التركيز الطبيعي من ثاني أكسيد الكربون ضروري لنشاط الإيثيلين. ويعمل غياب الأكسجين على زيادة التأثير المثبط لثاني أكسيد الكربون.



شكل ١٦-٣: التخليق الحيوي لغاز الإثيلين في الأنسجة النباتية (Davies 2004)

وقد أمكن تقليل التأثير السلبي للغاز على نمو القسم الدامية للقرنفل في الأنسجة السقة بانتصاضه من جو المزرعة بوضع كاس به محلول برمنجانات البوتاسيوم في الوعاء المستعمل للزراعة حيث يمتص حوالي ٧٠% من الإثيلين الموجود في الوعاء.

إنتاج الإثيلين في مزارع الأنسجة وتأثيره عليها

ينتج غاز الإثيلين طبيعياً في كل أنواع مزارع الأنسجة ويزيد معدل تصنيعه بتعرض الخلايا للإجهاد فكل سبيل المثال تصبح بعض المواد كالكافيتول والبولي إيثيلين جليكول (PEG) المستعملين لزيادة الضغط الاسموزي أثناء عزل وزراعة

البروتوبلاست من تصنيع الإثيلين. وقد أنتج بروتوبلاست البطاطس المعزول في وجود PVP كالوس بنسبة أكبر عند إضافة ١٠٠ ميكروجرام من AgS_2O_3 إلى البيئة (Perl et al., 1988). ولاحظ (Puschmann et al. (1985 أن الأوكسينات تشجع تخليق الإثيلين في مزارع الأنسجة حيث يفترض أنها تعمل على استحثاث نشاط بعض الجينات التي تلعب دوراً في تخليقه. ويختلف معدل تصنيع الإثيلين في المزرعة باختلاف الفترة الزمنية عقب تجديد المزرعة، ففي الدخان كانت أعلى زيادة بعد ٥ أيام من النقل ثم قلت النسبة خلال ٦-١٠ أيام التالية. ويفترض حدوث تثبيط لتكوين البراعم العرضية خلال الخمسة أيام الأولى ثم تكتفت بعد ذلك بانخفاض التركيز بعد ١٠ أيام من النقل.

وكما هو الحال في النباتات الكاملة تزيد نسبة إنتاج الإثيلين في مرحلة شيخوخة المزرعة، وتكون أعلى ما يمكن في المعلق الخلوي في طور الثبات حيث تكون المواد المغذية محدده للنمو. ولأن الإثيلين ينتج طبيعياً في كل أنواع مزارع الأنسجة فهو يتجمع داخل الأوعية خصوصاً تلك المحكمة الغلق ويتباين التركيز على أساس نوع النسيج، ووزنه، وحجم الوعاء، ونوعية الغطاء ودرجة إحكامه، والإضاءة. ويلاحظ أن الإثيلين يزيد تركيزه داخل الأوعية عند تعريضها للهب أثناء الزراعة بغرض القضاء على التلوث. لكن ارجع (Santamaria et al. (2000 السبب في تحسن نمو مزرعة نباتات *Delphinium* عند استخدام أوعية ذات أغشية منفذة إلى انخفاض معدل الرطوبة في الأوعية وليس لإنخفاض نسبة الغاز. هذا ويؤثر الإثيلين على زراعة الأنسجة في مراحلها المختلفة كما يلي:

١. عزل النسيج وتكوين الكالس

كما سبق القول تتشابه تأثيرات الإثيلين مع الأوكسين، حيث يزيد الأوكسين من التصنيع الحيوي ل-ACC الذي يوجد غالباً بتركيزات منخفضة في الأنسجة النباتية. لكن في المعلق الخلوي لا تحل الإضافة الخارجية للإثيلين محل الأوكسين الضروري لانقسام

الخلايا (Moshkov *et al.*, 2008). وعند جرح الأنسجة يزيد مؤقتاً إنتاج الإثيلين بالأنسجة النبات، وبهذا تتكون كمية معنوية منه عند عزل الأنسجة لزراعتها. وإذا تم تنمية الأفرع التي ستكون مصدر للأوراق المستعملة لإنتاج البروتوبلاست في أنسجة مصدفة اليه ثيوسلفات الفضة فإن إنتاج الإثيلين يكون أقل.

من المتوقع أن يشجع تراكم الإثيلين في مزارع الأنسجة نمو الكالس، فالكالس يتكون على السوق والجذور في النباتات الكاملة عند إحداث جرح بها. وفي عدد من النباتات توجد علاقة بين معدل تصنيع الإثيلين وتكوين الكالس فالمركبات التي تثبط الإثيلين تثبط تكوين الكالس بنفس معدل إضافتها. لكن في بعض الحالات سجلت بعض النتائج التي تدل على تثبيط الإثيلين لتكوين الكالس. ففي البطاطس يحدث تغليظ في حفر الخلايا المفصولة وتثبط انقسام الخلايا غير المتكشفة. وقد وجد أن تركيز ١.١ حجم/مليون حجم يمنع تكوين الكالس وقصبيات الخشب في أجزاء النخاع أي أن الغاز منع إعادة تكشف الخلايا، وبمجرد تأهيل الخلايا المتكشفة وإعادة برمجتها للانقسام فإن الغاز لا يؤثر عليها. وفي أصناف الأرز المعروفة بزيادة معدل إنتاجها من الإثيلين تزيد نسبة الموت الموضعي لأجزاء الكالس بالمقارنة بالأصناف التي تخلق الغاز بنسبة أقل. ويثبط رفع الإثيلين في جو المزرعة تكوين الكالس في الأصناف التي تخلق الإثيلين بمعدل عالي (Adkins *et al.* 1990). لكن لاحظ (Al-Khayri & Al-Bahrany 2001) أن نترات الفضة تزيد من وزن كالوس النخيل في غياب السيتوكينين من البيئة.

٢. تكشف ونمو الأسطاء

حتى الآن لم يتضح دور الإثيلين في عمليات الكشف العرضي للبراعم بصورة دقيقة بالرغم من معرفة تأثيره المثبط على الحركة القطبية للأوكسين والذي يؤثر بالطبع على الكشف وتكوين الأعضاء. ومن نتائج العديد من الدراسات اتضح أن هناك حد حرج من تركيز الغاز عنده يمتدح الكشف وزيادة هذا التركيز تؤدي إلى نتائج عكسية في

نبات *Helianthus annuus* لاحظ Robinson & Adams (1987) تثبيط الإثيلين لتكوين الأشطاء وكان التأثير ممتداً من معاملة البادرات التي استعملت كمصدر للمستأصل النباتي والتي نمت في الظلام، حيث يقلل الضوء من حساسية الأنسجة للغاز، ويمكن التأكد من ذلك بمعاملة البادرات بتركيز ١٠ ملليمول من AVG. كما ثبتت معاملة سوق البيجونيا بتركيز ٢-٢٠ ملجم/لتر من الإثيلين تكوين الأشطاء وشجعت تكوين الكالس. ويشجع كلا من الإثيلين وثنائي أكسيد الكربون اللذان يخلقان في الأنسجة النباتية أثناء الـ ١٥ يوم الأولى من زراعة الأوراق الفلقية للصنوبر تكوين البراعم العرضية إذا كانت الأوعية محكمة الغلق، وأرجع ذلك إلى تشجيع تكوين الإثيلين، ويقل معدل تكوين البراعم بانخفاض معدل تكوين الإثيلين. وفي الأوراق العصارية لنبات الليليم زاد عدد الأشطاء المتكونة عندما رفع تركيز الإثيلين في الجو المحيط بمعدل ١-١٥ حجم/مليون خلال ٣-٥ أيام الأولى من الزراعة (Moshkov et al., 2008). كذلك شجعت إضافة ACC بتركيز ١٠٠.١ ملجم/لتر إلى مزرعة التبوليب تكوين الأشطاء. لكن ثبت AVG تكوين الأشطاء في مزارع *Populus*.

غالباً يثبط الإثيلين الموجود في الجو المحيط بالبادرات والأفرع نمو الخلايا في المناطق الميرستيمية، وربما يثبط أيضاً تكوين الجذور في النباتات وحيدة الفلقة. ويكون هذا التأثير أقل في النباتات ثنائية الفلقة بالرغم من أن بعض النباتات مثل البسلة تكون شديدة الحساسية له. لكن في الواقع نادراً ما يلاحظ هذا التأثير المثبط. وتؤكد بعض الملاحظات التي سجلت في مزارع *Klaanchye* و البجونيا أن الإثيلين المتجمع في أنابيب الزراعة يثبط نمو الأشطاء بتقليل عدد السلاميات. وأدى تراكم الغاز عند تنمية أشطاء القرنفل في أوعية مغلقة إلى نقص في طول السلاميات، وكانت الأوراق شاحبة وأكثر إختزاناً للماء (Fal et al., 1999).

وأدت إضافة الإيثيفون إلى استعادة الأشطاء لشكلها المورفولوجي الطبيعي. كذلك أدت إضافة مولدات الغاز كالميثونين بتركيز ٥٠-١٠٠ ملجم/لتر مع وجود RAI إلى زيادة معدل تكوين الأشطاء في العديد من الأشجار الخشبية. لكن كان نمو أشجار البندق المتكشفة غير جيد تحت تأثير الميثونين في الأوعية المغلقة. ويتعرض مزارع عدد أجناس من نباتات *Ptilotus* إلى تركيزات مختلفة وفترات مختلفة للإيثيلين وذلك بغرض الأوعية في غرف زجاجية تحتوى على تركيز محدد من الغاز. زاد عدد الأشطاء وارتفاع نباتات *P. nobilis* عند تعرضها لتركيز ١٠٠ ملجم/لتر/ساعة/أسبوع ولمدة ثلاثة أسابيع. ولم يلاحظ هذا التأثير على مزارع *P. spicatus* حتى عند رفع التركيز إلى ٣٠٠ ملجم/لتر، لكن بهذه المعاملة زاد معدل التجذير إلى أربعة أمثال معاملة المقارنة كما استمرت الزيادة في وزن الجذور حتى بعد نقل النباتات على بيئة جديدة (Prameswara et al., 2009). وقد أشارت الدراسة السابقة إلى دور المعاملة بالإيثيلين في تلوث مزرعة *P. nobilis* حيث تبين وجود مستعمرات بكتيرية صفراء لامعة على سطح البيئة، وربما كانت ناتجة من تلوث داخلي للنسيج نشط بسبب ضعف نمو النبات بتعرضه للإجهاد بسبب المعاملة بالإيثيلين.

٣. تكشف ونمو الجذور

يؤدي حفظ النباتات فترة طويلة في جو مشبع بغاز الإيثيلين إلى زيادة تكوين الجذور على العقل. وقد شجع تركيز ٥٠ ميكروجرام من 1/100 تكوين الجذور العرضية من الأقراص الورقية المجهزة من نبات الطماطم في حين قُطعت المعاملة بالإيثيلين أو الإيثيفون التجذير، وذلك على الرغم من تشجيع الإيثيلين تخليق الأوكسين في الأنسجة. وزاد عدد الجذور المتكونة بخفض تركيز الإيثيلين بالتهوية أو بامتصاصه في محلول بكلوريت الزنبيق أو المعاملة بنترات الفضة بتركيز ١٧ ملجم/لتر لمدة نصف ساعة. وعند زراعة طبقة رقيقة من خلايا الدخان في وسط مناسب لإنتاج الجذور باستعمال

تركيز عالى من الأوكسينات ومنخفض من السيتوكينينات زاد إنتاج الإثيلين فيها بمعدل ١٠٠ مرة عن زراعتها فى وسط غير ملائم لتكوين الجذور. وكان التجذير متلازم مع إرتفاع نسبة الإثيلين والتي كانت فى أعلى معدل لها عند ٥٣٠ م، وإضافة أيونات الفضة إلى الوسط أعاقَت تكوين الجذور وشجعت تكوين البراعم العرضية. وما زال هناك جدل حول ما إذا كان الإثيلين هرمون تجذير أم لا.

٤. تكوين الأجنة الجسدية

وجد لحجم وعاء الزراعة تأثير على تكشف الأجنة الجسدية فى العديد من النباتات. يشير ذلك إلى أن المواد الطيارة المتكونة فى المزرعة وعند تركيز محدد تؤثر على تكوين الأجنة. ولاحظ (Chen & Chang 2003) أن التركيز المنخفض من ACC فى حدود ١٠-٥ ميكرومول اعاقَ الكشف المباشر للأجنة الجسدية من أوراق نبات *Oncidium* لكن عند رفع التركيز إلى ٢٠-٥٠ ميكرومولر تكشفت الأجنة. وفى البرتقال الشموتى شجع الإيثيفون بتركيز ١.٠-٠.٠١ ملجم/لتر تكوين الأجنة لكن التركيز الأعلى والذى تولد من إحكام غلق الأوعية ثبط تكوينها. وفى تجارب أخرى وجد أن الإثيلين يثبط تكوين الأجنة الجسدية وأن إضافة ١-٣ ملجم/لتر من نترات الفضة إلى مزارع المتوك لبعض أصناف *Brassica* يزيد عدد الأجنة المتكونة بل ويساعد على كشف الأجنة فى بعض الأصناف التى كان من الصعب إنتاج الأجنة الجسدية فيها. كذلك شجع اسيتيل حامض الخليك كشف الأجنة لكن بدرجة أقل من نترات الفضة. ووجد أيضاً أن الكالس غير المكون للأجنة الجسدية من *Picea abies* ينتج إثيلين ١٠ مرات قدر الكالس المكون للأجنة.

٥. تكوين الأبصال

يلعب التخليق الحيوى للإثيلين دوراً هاماً فى تكوين الأبصال على الأفرع المتكشفة عرضياً من زراعة الأوراق العصارية فى الليليم ويتوقف ذلك على وقت

التصنيع. وكان عدد الأشطاء التى كونت أبصال مرتفعاً عندما كان تركيز الإيثيلين مرتفع خلال الأسبوعين الأولين من الزراعة. وإذا أقف التخليق الحيوى للإيثيلين خلال هذه الفترة فإن تكوين الأبصال على النبيتات المتكشفة ينخفض، ويمكن بإضافة الإيثيلين بتركيز ١٠-١ جزء/مليون جزء خلال ٣-٧ أيام الأولى من النمو تشجيع تكوين الأبصال.

٦. تكوين المركبات الثانوية

هناك بعض المواد الطيارة الأخرى مثل الميثان، والإيثان، والاسيتالدهيد، والإيثانول يتم إنتاجها فى مزارع الأنسجة تحت ظروف التنفس الموجودة بالمزرعة وتؤثر بدرجات مختلفة على النمو والتكشف. كما ينتج الإيثان عن الخلايا التى تتعرض للتجريح أو الإصابة، ووجد أن تكوين الأجنة الجسدية يثبط فى نخيل البلح والجزر بالمعاملة بالإيثانول.

سادساً: المركبات عديدة الأمين ومنظمات النمو الثانوية

Polyamines & secondary growth regulators

يعتقد أن الخمس مجموعات التى تعمل كمنظمات نمو نباتية والتى سبق التحدث عنها قد لا تكون مسؤولة مباشرة عن تنظيم عمليات النمو فى النبات. لكن يتم ذلك عبر رسل ثانوية secondary messengers تقوم بتنظيم التعبير الجينى وتصنيع البروتينات وهذه المركبات تضم الأوليجوسكريد، والاستيرول، والانزيتول ثلاثى الفوسفات، والمركبات عديدة الأمين. لكن يعترض البعض على إضافة المركبات عديدة الأمين ضمن منظمات النمو الثانوية إذ تصنف كمجموعة مستقلة لأنها تلعب دور كبير وواضح كمنظم للنمو حيث تؤثر فى عملية تضاعف الحامض النووى والاستجابات المورفولوجية المختلفة (Bais & Ravishankar, 2002). وتحتوى كل النباتات الراقية على مركبات اليقاتية عديدة الأمين ذات وزن جزيئى منخفض ضرورية للنمو وأهمها putrescine, spermine, tetraamine.

ويعتقد أن هذه المركبات والتي توجد أما حرة أو مرتبطة ذائبة أو غير ذائبة تلعب دوراً في مدى تأثير ظروف الإجهاد البيئي على النمو والتطور. ويكون مستوى هذه المركبات مرتفعاً في مناطق النمو النشطة كالقمم النامية في الأفرع والجذور والخلايا غير المتكشفة أو تلك التي دخلت للتو في مرحلة التكشف. ولذا يرجع استجابة الأنسجة الحديثة لزراعة الأنسجة مقارنة مع الأنسجة البالغة إلى ارتفاع محتواها من تلك المركبات (Rey et al. 1994)، أما (Bais et al. 2000) فيعتقد أن الإضافة الخارجية للمركبات عديدة الأمين تعمل على إعاقه فعل الإثيلين وبالتالي تزيد من استجابة النسيج في مزارع الأنسجة. كما ثبت تخليق هذه المركبات في الأنسجة النباتية المنزرعة معملياً، وتعمل على استحثاث فعل منظمات النمو. يتم التصنيع الحيوي لهذه المركبات من بعض الأحماض الأمينية مثل الأرجينين ويختلف مسار التصنيع باختلاف الأنواع وما إذا كان هناك نمو وتكشف أم لا، وتنشط الإنزيمات المصنعة لها مثل ornithine decarboxylase أثناء انقسام الخلايا وبينما ينشط أنزيم arginine decarboxylase أثناء استطالة الخلايا. ويتأثر التصنيع بمكونات البيئة فيزيد تصنيع putrescine عند إضافة أملاح الأمونيوم بالمقارنة مع النترات، والمواد المثبطة للإنزيمات السابق ذكرها تثبط النمو والتكشف (Cou'ee et al., 2004).

وقد وضح (Moshkov et al. 2008) الدور الذي تقوم به المركبات عديدة الأمين في مزارع الأنسجة فيما يلي:

١. تعمل المركبات عديدة الأمين ككاتيونات وترتبط بقوة بالأحماض النووية والبروتينات التي تحمل شحنة سالبة. وتعمل بذلك على ثبات الأحماض النووية المرتبطة بها فتكون أكثر مقاومة لإنزيمات التحلل والحرارة.
٢. قد يكون لها نفس دور البوتاسيوم والكالسيوم والماغنسيوم في النبات.
٣. لها دور في ثبات الرقم الهيدروجيني للبيئة، وفي الظروف الحامضية يزيد تركيز الألومنيوم من التخليق الحيوي لـ putrescine.

٤. ربما ترجع زيادة النمو بإضافة هذه المركبات إلى مقدرتها على الارتباط بمجموعات الفوسفوليبيدات وبعض المركبات الأخرى فى الغشاء الخلوى مثل السكريات العديدة التسكر والأحماض الأمينية.
٥. تحور فعل بعض الإنزيمات وتزيد من تضاعف وترجمة الحامض النووى، وتكون أيضاً ضرورية لتحويل trna من الحالة غير النشطة إلى الحالة النشطة.

هناك تداخل لهذه المركبات مع منظمات النمو فإضافة المركبات عديدة الأمين إلى مزارع الأنسجة يكون لها تأثير مشابه للأكسين فى انقسام الخلايا واستطالتها وفى بعض الحالات يمكن أن تحل محل الأوكسينات. ويعتقد أن كلاهما يعمل معا فى الغشاء الخلوى مع أيون الكالسيوم فتشجع تخليق أنزيم البيروكسيديز بالأوكسينات يعتمد على وجود الكالسيوم. لكن المركبات عديدة الأمين تسبب سرعة خروج أيون الكالسيوم من الغشاء الخلوى وتنشط التخليق الحيوى وفعل الإثيلين وبالتالي تؤخر ظهور الشيخوخة فى معلق خلايا الورد بفعل الإثيلين (Muhitch *et al.*, 1983). والإثيلين نفسه ممكن أن يقلل من معدل التخليق الحيوى للبولى أمين باختزال نشاط أنزيم الأرجينين ديكربوكسيليز وإيقاف التخليق الحيوى للإثيلين باستعمال بعض المواد مثل AVG يزيد من تخليق spermine واستعمال مثبطات تخليق المركبات عديدة الأمين قد تؤدى إلى زيادة أو نقص فى تخليق الإثيلين. فى أصناف البسلة المتقدمة يزيد GA_3 من الأرجينين ديكربوكسيليز مما يؤدى إلى زيادة تركيز المركبات عديدة الأمين فى الأنسجة. وتتباين كمية البولى أمين فى السلالات المختلفة حسب طول سلاميات ومحتواها من GA_3 ويؤدى التنشيط الحيوى لتخليق المركبات عديدة الأمين إلى قصر سلاميات فى السلالات المتقدمة (Smith *et al.*, 1985). وبالرغم من ذلك يبدو أن المركبات عديدة الأمين تؤثر فقط فى انقسام الخلايا لكن الجبريلينات تؤثر فى النمو بزيادة معدل استطالة وانقسام الخلايا، وبذلك يمكن القول أن البولى أمين يساهم جزئيا فى عمليات النمو.

وجد أيضا أن السيتوكينينات تؤدي إلى زيادة في التخليق الحيوي للبولى أمين ويرجع ذلك إلى تنشيط أنزيم الأرجينين ديكر بوكسيليز. وكما هو الحال في فعل السيتوكينينات تؤدي المركبات عديدة الأمين إلى تأخير الشيخوخة. ويفسر البعض تأخير الشيخوخة بالمعاملة بالسيتوكينينات إلى زيادة محتوى الأنسجة من المركبات عديدة الأمين والتي تعمل على ثبات الغشاء الخلوي ضد إنزيمات التحلل ومنع أكسدة الليبيدات وهدم الأحماض العضوية.

دور المركبات عديدة الأمين في زراعة الأنسجة

١. تكوين الكالس

تشجع المركبات عديدة الأمين انقسام الخلايا وتكوين الكالس ويزيد تأثيرها الإيجابي عندما تضاف مع منظمات النمو. وربما يرجع السبب في ذلك إلى تأثير تلك المنظمات على تصنيع الإثيلين. ولوحظ فعلاً تحسين في نمو الكالس لعدد من النباتات بإضافة spermidine و spermine. والمركبات عديدة الأمين المرتبطة مع بعض الفينولات مثل أحماض cumaric و cinnamic تشجع من الانقسام الخلوي ويتوقف مدى التشجيع على التركيز المضاف منها، وهناك حد حرج بعده يثبط النمو. وقد وضحت دراسة (Tang & Newton 2004) أهمية محتوى الكالس من المركبات عديدة الأمين في اكتساب الكالس اللون البنى وبالتالي موته وعدم التكشف في أشجار الصنوبر. وقد سجل انخفاض spermidine و spermine و putrescine في الأنسجة ذات اللون البنى بالمقارنة مع الكالسات السليمة بمقدار ٦٣.٨ - ٧١.٥ و ٦٥.٥ - ٤٧ و ٧٤.٥ - ٦٢.٣ % للمركبات السابقة على التوالي.

٢. التكشف

ينخفض تركيز مركبات البولى أمين خاصة spermine و spermidine بتقدم عمر النبات وقد يكون ذلك سبباً في انخفاض قدرتها على التجذير والتكشف. كذلك أدت إضافة مثبطات تخليق المركبات عديدة الأمين إلى منع تكوين الجذور العرضية في

الدخان، وقد شجعت تكوين الدرنات في البطاطس بمنع تخليق الجذور العرضية (Bais & Ravishankar, 2002) لكن تشير بعض الأبحاث إلى عدم فاعلية المركبات عديدة الأمين في تنشيط الجذور العرضية. وتؤدي زيادة معدل تخليق البولي أمين داخلياً إلى تثبيط تكوين مبادئ الجذور على العقل والسويقة الجنينية العليا للفصوليا المعاملة ب IBA ويزيد تجذير هذه الأجزاء عند إضافة ٥٠ ميكرومولر من Spermidine في وجود IBA وتساهم المركبات عديدة الأمين في إلغاء التأثير المثبط للضوء على تكوين الجذور.

٣. تكوين الأجنة الجسدية

أشارت بعض الأبحاث إلى أهمية المركبات عديدة الأمين في تكوين الأجنة الجسدية، مثلاً وجد أن هناك زيادة في معدل التصنيع الداخلي للمركبات عديدة الأمين أثناء تكوين الأجنة الجسدية في الجزر البري. وانخفض عدد الأجنة المتكونة بإضافة المواد المثبطة لتصنيع المركبات عديدة الأمين، وانعكس هذا التأثير بإضافة المركبات عديدة الأمين. ويتوقف تأثير الإضافة الخارجية على النوع النباتي والصنف المنزرع فقد أوضح (Martinez et al., 2000) عند دراسة استجابة صنفين من البصل لتكوين نباتات أحادية من زراعة الأزهار في بيئة محتوية على putrescine لمدة ١٥ يوم ثم نقلت بعدها إلى بيئة الكشف المحتوية على spermidine أن استجابتهما متباينة. وتشير النتائج المبينة في جدول رقم (٦-٣) أن إضافة ٢ ميكرومولر من putrescine و ١٠ ميكرومولر من spermidine كانت أفضل المعاملات في إنتاج الأجنة الأحادية. وربما تكون النسبة بين spermidine و putrescine هي المنوط بها استحثاث تكوين الأجنة الجسدية في أصناف الأرز المعروف بمقدرتها العالية على تكوين الأجنة الجسدية حيث كانت النسبة ٢.٣ أما بارتفاعها إلى ٣.٨ فتقل تلك القدرة، أما الأصناف التي كانت تلك النسبة فيها ١٠ فلم يكن لها القدرة على تكوين أجنة جسدية. (Shoeb et al., 2001)

جدول ٦-٣: تأثير إضافة putrescine و spermidine على تكشف الأجنة والأجنة الأحادية من زراعة أزهار الصنف Valcatorce INTA لنباتات البصل (Martinez *et al*; 2000).

عدد النباتات الأحادية المتكونة	% لتكوين الأجنة	عدد الأجنة المتكونة	عدد الأزهار المنزرعة	Spermidine Putrescine	
				ميكرومول	
١	٠.٩	٣	٣٠١	٠.١	٠.١
٢	١.٢	٤	٣٣٠	٠.١	٠.١
٣	٢.٣	٤	٢٩٨	٠.١	٠.١
٣	١.٦	٥	٣١٣	٠.١	٠.١
٢	١.٠	٣	٢٩٥	٠.١	٠.٥
١	٢.٨	٧	٢٥١	٠.١	٠.٥
٠	٠.٧	٢	٢٩٠	٠.١	١.٠
٠	١.٩	٥	٢٦٣	٠.١	١.٠
٤	٠.٧	٢	٢٦٨	٠.١	٢.٠
٠	٢.٠	٦	٣٠٥	٠.١	٢.٠
١٦	١.٥	٤٤	٢٩١٤		المجموع

سابعاً: الاليجوسكريد Oligosaccharides

وهي عبارة عن سكريات معقدة تخلق طبيعياً في الأنسجة النباتية وتتكون من اثنين أو أكثر من السكريات الأحادية، ويعتقد أن لها دور منظم في ميكانيكية عمل الخلية، وتعتبر درجة تعدد السكريات المكونة لها عامل أساسى فى تحديد نشاطها الوظيفى. وينأتى دورها المنظم لعمل الخلية عندما تتحرر من الجدار الخلوى بواسطة إنزيمات التحلل

المائي التي تنشط عند تغيير الرقم الهيدروجيني للجدار أو بوجود منظمات النمو التي تلعب دور في تغيير الرقم الهيدروجيني مثل الأوكسينات أو السيتوكينينات. من المعروف أن إنزيم β -1,3 glucanase هو المسئول عن استطالة جدار الخلية والذي يلاحظ نشاطه أو تثبيطه أحياناً عند معاملة الخلية بالأوكسين أو السيتوكينين. وتعمل مركبات الاليجوسكريد على استطالة الجدر الخلوية و انقسامها بطريقة مماثلة لفعل IAA وإضافتها مع الأوكسين تشجع من عمله أو تثبطه اعتماداً على التركيزات المضافة من كليهما والرقم الهيدروجيني للوسط. وتنظم مركبات الاليجوسكريد عمليات التكشف، وقد اقترح أن الاليجوسكريد المتحررة من القمم النامية هي المسئولة عن السيادة القمية وتثبيط نمو البراعم الإبطية عند حركتها لأسفل.

ثامناً: الاسترولات Sterols

تشجع بعض المركبات الاستيرولية مثل Stigmasterol و فيتامين D2 و D3 والتي تعتبر ضرورية للنمو الطبيعي للعظام في الثدييات تكوين الأشطاء في بعض النباتات مثل التفاح والكريز. لكن أدت الزراعة لفترات طويلة في بيئة محتوية على فيتامين D3 بتركيز ١٠ ملجم/ لتر إلى إصفرار الأوراق. كذلك أمكن استحداث تكوين الجذور في بعض النباتات بتركيزات منخفضة من فيتامين D3 لا تتجاوز ٠.١ ملجم/لتر، ولم يكن للتركيزات العالية نسبياً تأثيراً ضاراً. وكان تأثير فيتامين D2 و D3 على تكوين الجذور تأثيراً مساعداً أو إضافياً للأوكسين. وتأثر عدد الجذور المتكون على العقلة بعمر العقلة وتركيز المواد المضافة. وهناك بعض الدلائل على أن فيتامين D2 و D3 يقللان من نشاط إنزيم البيروكسيداز في الأنسجة المعاملة مما يحافظ على IAA من الهدم. هذا ويتوقف التصنيع الطبيعي لهذه الفيتامينات على التعرض للأشعة فوق البنفسجية (Moshkove et al., 2008).

تاسعاً: الفحم المنشط Activated charcoal

الفحم المنشط عبارة عن كربون موزع في تنظيم خاص يضمن وجود شبكة كبيرة جداً من الثقوب الدقيقة التي تضمن مساحة سطح وحجم كبير جداً تمكنه من قدرة امتصاص فريدة. ويختلف الفحم المنشط عن الكربون الأولي بعدم وجود الشوائب غير الكربونية وأكسدة سطح الكربون. ويتم الحصول على الفحم المنشط والذي يستعمل لإدخال الغازات في أغراض عدة بأكسدة الخشب في وجود الماء أو البخار واستعمال درجات حرارة عالية، وبذلك تتكون أسطح إدمصاص داخلية واسعة. وينصح في مزارع الأنسجة باستعمال الفحم المنشط المصنع من أصل نباتي حيث يحتوى على أسطح نشطة بنسب أعلى من تلك الموجودة في الفحم حيواني بحوالى ٩٥-٩٩%. وتتوقف خصائص الفحم المنشط على الطريقة التي حضر بها، فليس لكل الأنواع التجارية نفس الخصائص والتأثيرات الفسيولوجية. وتشير التحليلات الكيميائية إلى احتواء الفحم المنشط على بعض أيونات العناصر مثل الحديد والنيكل والألومنيوم. لكن ليس من المعلوم ما إذا كانت هذه الأيونات تؤثر في النمو أم لا. يضاف الفحم المنشط الناعم إلى بيئة النمو شبه الصلبة أو السائلة لإعطائها بعض المميزات في مراحل معينة من النمو. وبالرغم من أن الفحم المنشط لا يعتبر ضمن منظمات النمو إلا أنه من الخصائص حتى عند استعماله بتركيزات غير عالية نسبياً (تتراوح بين ٠.٢-٣% وزن/حجم) ما قد يعادل فعل منظمات النمو وبعض المكونات الأخرى في البيئة. وتعتمد معظم التأثيرات الفسيولوجية للفحم المنشط على قدرته على إدمصاص مدى واسع من المركبات التي تكون مثبطة للنمو غالباً. ومن أهداف استعمال الفحم المنشط في زراعة الأنسجة ما يلي:

١. يساعد على إمتصاص المواد السامة التي توجد في البيئة مثل مشتقات الفينول والتي تسبب تلون البيئة باللون الأسود أو البنى وتلك مواد سامة للنسيج المنزوع خصوصاً عند بدء تأسيس المزرعة كما في نباتات البلازجونيوم. وكذلك المركبات التي تتكون أثناء التعقيم مثل مركب (HMF) 1,5-hydroxymethy-furfural والذي ينتج من تعقيم السكر في وسط مانل للحموضة (Pan & Van Staden, 1998)، وهو

مركب مثبط لتكوين الأجنة الجسدية من متك الدخان. كما يستعمل الفحم المنشط لإدمصاص الأحماض الدهنية المثبطة للنمو والتي توجد في بعض الأنواع التجزئة غير العالية النقاوة من الآجار.

٢. يدمص الفحم المنشط بعض المواد العضوية مثل منظمات النمو ولهذا الهدف يستعمل بتركيزات تتراوح بين ٠.١ إلى ١% وزن/حجم للبيئة المستعملة، لإزالة الأوكسينات والسيتوكينينات وكذلك ABA من البيئة. لكن يجب الإشارة إلى صعوبة تحديد التركيز المتاح من منظمات النمو في البيئة التي اضيف إليها الفحم المنشط. يعتقد البعض أن المواد التي تدمص على أسطح الفحم المنشط كالعناصر الغذائية ومنظمات النمو، وكذلك بعض المواد التي توجد طبيعياً في تركيبه يعاد إنسيابها للبيئة مرة أخرى للبيئة (Johansson et al., 1990). هذا وقد استعمل الفحم المنشط مع GA₃ لتشجيع إنتاج الأشطاء في *Prunus*. لكن يجب الأخذ في الاعتبار أن التركيزات العالية من الفحم المنشط تجعل منظمات النمو الموجودة في البيئة غير ميسرة للإمتصاص، فعند استعماله بتركيز ٣% لإزالة اللون الأسود من الوسط المستعمل لنمو أنسجة نخيل البلح كان من الضروري رفع تركيز 2,4-D المستعمل بمعدل ٥. ٢٠ مرة لإعطاء نفس الأثر الوظيفي في تكوين الأجنة الجسدية. وبالطبع فإن الفحم المنشط له قدرة عالية على إدمصاص الإثيلين مما يقلل من تأثيره الوظيفي في الأنسجة المنزرعة.

٣. يدمص الفحم المنشط بعض المغذيات العضوية مثل حامض النيكوتينك والفوليك وربما يعمل على إزالة بعضها تماماً من الوسط لكن لا يدمص الميوانوزيتول.

٤. يعمل الفحم المنشط على رفع الرقم الهيدروجيني لبيئة MS بعد التعقيم وأثناء تخزين البيئة بعد التعقيم لمدة ١٤ يوم بمعدل ٠.٧٥ وحدة عند إضافته بمعدل ٠.٥%. ويرجع ذلك إلى قدرته على إدمصاص الكاتيونات. وقد ترجع بعض تأثيرات الفحم المنشط على النمو والتكشف إلى التغيير في الرقم الهيدروجيني. وقد أشار Eymar et al. (2000) أن الرقم الهيدروجيني للبيئة غير المحتوية على الفحم المنشط والمستعملة لزراعة نباتات التمرحنة *Lagerstroemia indica*، إنخفض بمقدار ١.٠٣ وحدة أما تلك المحتوية على الفحم المنشط فقد ارتفع رقمها الهيدروجيني بمقدار ٠.٣٨ وقد أدى إنخفاض الرقم الهيدروجيني إلى عدم إمتصاص أيون النترات المفترض إمتصاصه في المرحلة الأولى من الزراعة، وإمتص أيون الأمونيا. وأدى ذلك إلى تغيير في درجة التوصيل الكهربى للبيئة، حيث انخفض أثناء الزراعة في البيئة المحتوية على

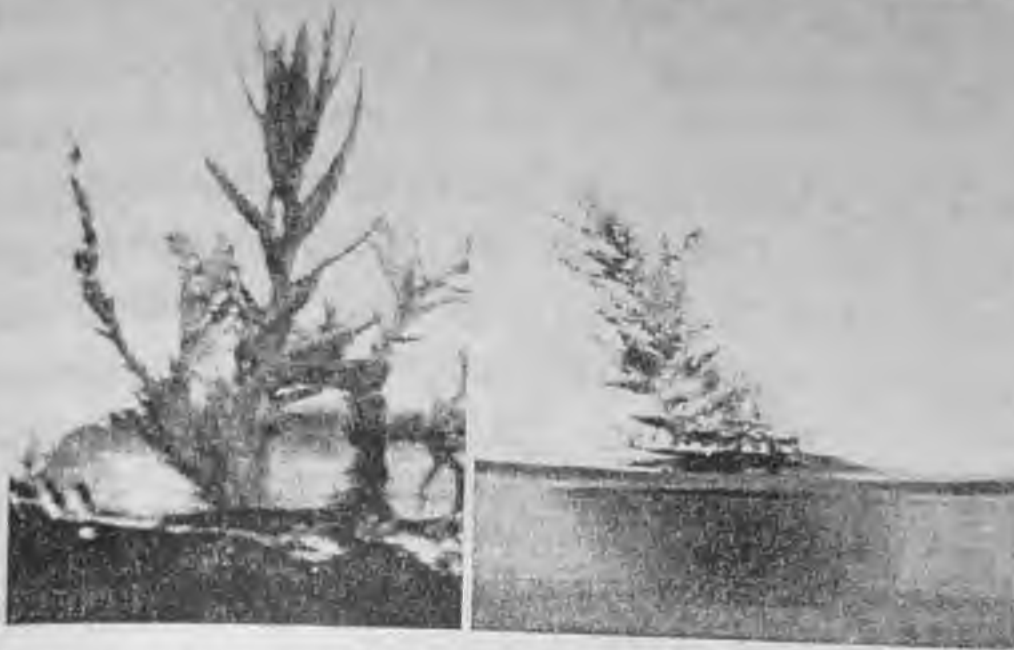
الفحم المنشط وزاد في البيئة الخالية منه بشرط عدم وجود BA. ويعتبر انخفاض درجة التوصيل الكهربى مؤشراً على إمتصاص المغذيات من البيئة. ٥. يشجع تجذير العقل وقد يعزى ذلك إلى منع الضوء الذى يثبط التجذير وتشجع تفاعلات الظلام. وإن كان الأمر كذلك فيمكن توفير الظلام حول الجزء المحتوى على بيئة النمو من الوعاء بلفه بورق ألومنيوم أو إضافة طبقة سطحية من الفحم غير المنشط.

٦. تشجيع التكشف وبالأذات للأجنة الجسدية والنباتات الأحادية من زراعة المنك لبعض الأنواع مثل نباتات Anemone وكذلك تكشف الأشطاء فى بعض الأنواع، فعلى سبيل المثال لم تتكشف أى أشطاء من زراعة الأوراق الحشفية لأبصال *Lilium longiflorum* إلا بعد إضافة ١% وزن/حجم من الفحم المنشط، لكن يتوقف التأثير على الموضع المأخوذ منه الجزء النباتى.

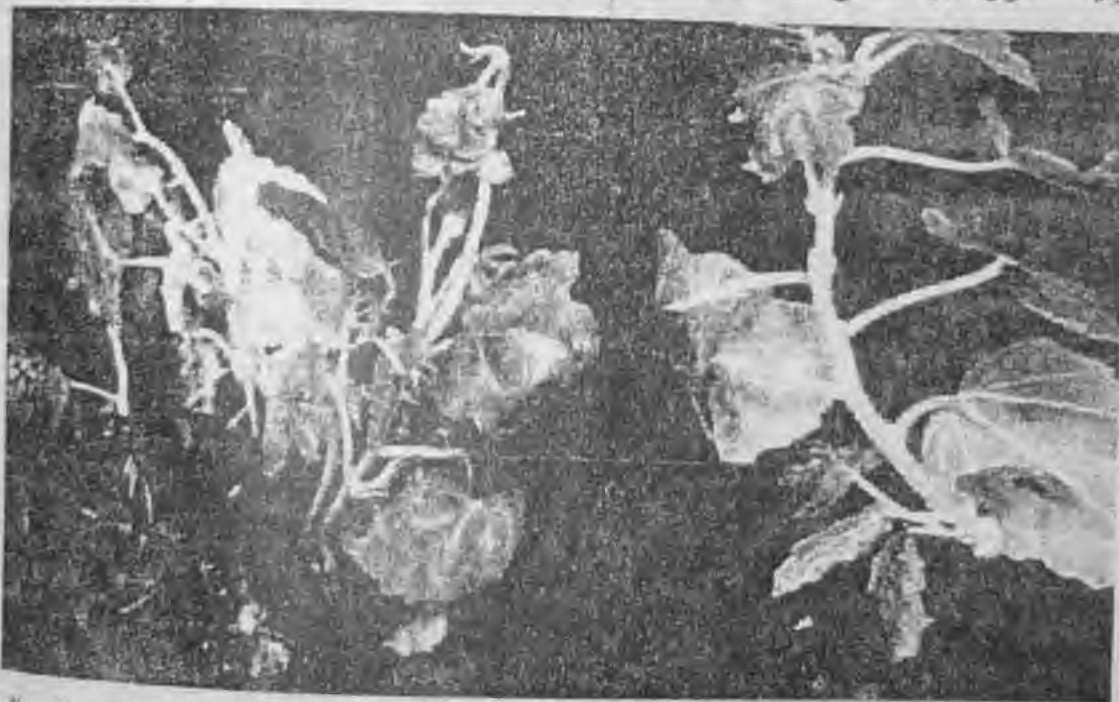
مما سبق يلاحظ أن إضافة الفحم المنشط إلى بيئة النمو يكون له فى غالب الأمر تأثير إيجابى فى التخلص من المواد الفينولية التى تسبب تلون البيئة باللون الأسود أو البنى (شكل رقم ٣-١٧) وإحداث سمية للنسيج المنزرع وإنخفاض نسبة نجاح تأسيس المزرعة. وقد وجد (Alkhubry 2008) أن إضافة الفحم قد سببت زيادة فى معدل تكشف وعدد أشطاء التين المكشوفة من زراعة العقد الساقية (شكل رقم ٣-١٨). لكن قد يكون للفحم المنشط تأثير سلبياً على تركيز وفاعلية منظمات النمو وبعض المكونات الأخرى للبيئة، لذا اتجه بعض الباحثين كما أشار (Pierik 1987) إلى استعمال طرق أخرى التخلص من المواد الفينولية ومنها:

١. غسيل الجزء النباتى بعد التعقيم السطحي بمحلول محتوى على مركب diethyl-dithiocarbonate (DIECA) بتركيز ٢ جم/لتر لمنع أكسدة الفينولات. أو على الأقل غمس الجزء النباتى بعد إعداده فى ماء قبل وضعه فى البيئة.
٢. إضافة مادة PVP عديدة البلمرة بتركيز يتراوح بين ٠.٢٥-١ جم/لتر.
٣. إضافة مضادات الأكسدة مثل أحماض الستريك، الاسكوربيك لمنع أكسدة المواد الفينولية. أو إضافة الأحماض الأمينية الجلوتامين والأرجنين والأسبرجين.

٤. استعمال البيئة السائلة لتقليل تركيز المواد السامة في المنطقة المحيطة بالنسيج، أو نقل المزرعة إلى بيئة شبه صلبة جديدة على فترات متقاربة.
٥. الاقلال من الضرر أى التجريح الحادث للجزء النباتى أثناء إعداده.



شكل ٣-١٧: على اليمين تأثر المستأصل النباتى لأشجار العرعر *Juniperus communis* بالمواد الفينولية المفروزة من النسيج، وعلى اليسار نجاح النمو بإضافة الفحم الى البيئة.



شكل ٣-١٨: على اليمين عدم تكوين أشطاء عرضية على العقد الساقية للتين في بيئة خالية من الفحم النباتى ، وعلى اليسار تكوين مزيد من الأشطاء بإضافة ٢ جم/لتر من الفحم النباتى للبيئة.

عاشراً: الأثر الوظيفي للتجريح The physiological effect of wound

أثناء فصل الجزء النباتي لابد من إحداث تجريح له، على الأقل يتمثل ذلك فى قطع الساق لفصل القمة النامية، أضف إلى ذلك الجروح والخدوش البسيطة التى تحدث دون قصد باستعمال الأدوات المختلفة. ولهذه الجروح تأثيرات مشابهة لمنظمات النمو فبعضها مثبط للنمو وبعضها مشجع فيلاحظ أحياناً تكوين الكالس فى منطقة القطع دون أى إضافة هرمونية. لكن حقيقة المواد المتكونة بسبب التجريح مازالت غير معروفة على وجه الدقة. فعلى سبيل المثال يكون للأجزاء النباتية المفصولة من النبات حساسية أعلى للأوكسين من النباتات الكاملة ولا يعرف بالضبط سبب ذلك وإن كان يعتقد أن السبب يرجع إلى حدوث الجروح إما بطريقة مباشرة أو غير مباشرة بافتراض أن هناك هرمون يخلق فى منطقة الجرح. وقد افترضت هذه النظرية أولاً من قبل Haberlandt فى سنة ١٩٢١ حيث لاحظ أن انقسام خلايا البطاطس الموجودة عند مكان الجرح ينخفض إذا تم غسل الجرح بالماء عدة مرات وبإضافة خلايا مهروسة إلى منطقة الجرح مرة أخرى شجع انقسامها بشدة. واقترح أن هرمون الجروح يتفاعل مع منظم نمو آخر غير معروف موجود بأنسجة البطاطس. وقد يكون للجروح تأثير مثبط أو مشجع لمزارع الأنسجة كما يتضح مما يلى.

١. التأثير المثبط

تعيق الجروح وبعض الإجهادات البيئية الأخرى بصورة مؤقتة قدرة الخلايا المجاورة على تنظيم إستبدال الهيدروجين والبوتاسيوم خلال الغشاء الخلوى ويفقد البوتاسيوم مبدئياً من الأنسجة المجروحة، مما يؤثر على ثبات الضغط الاسموزى للخلية. كذلك يحدث تكسير سريع للبيدات الموجودة فى الأغشية الخلوية بتأثير تنشيط إنزيمات الأكسدة وتحلل الليبيدات. وتؤدى هذه الإنزيمات إلى تكوين الشوارد الحرة الضارة بالأنسجة والتى ربما تسبب الكثير من الضرر أثناء تأسيس المزرعة (Dan 2008).

وتمتلك النباتات الكاملة والأنسجة المفصولة منها أحياناً وسائل حماية ضد هذه الشوارد الحرة، فيلاحظ زيادة نشاط إنزيم البيروكسيداز الذى يقلل من فعل الأكسدة بالشوارد الحرة. ويزيد معدل وجود الشوارد الحرة أثناء عزل البروتوبلاست بسبب استعمال إنزيمات هدم مكونات الجدار الخلوى ويمكن تقليل الضرر الحادث أثناء عزل البروتوبلاست باستعمال superoxide dismutase أو مضادات الأكسدة مثل n -propylgallat. ويبدو أن الأكسجين النشط يعمل على نشاط إنزيمات الأكسدة لمكونات الجدار الخلوى وتعمل مضادات الأكسدة على ثبات مكونات الجدار بتنشيط إنزيمات lipooxygenase. وقد لاحظ (Emek & Erdag, 2007) أنه يمكن التغلب على المواد الفينولية التى تسبب موت المستأصلات النباتية بتقسيم أبصال الجلادبولس طولياً وليس عرضياً. كما تستحث الجروح تكوين الإثيلين بتشجيع تحويل ACC إلى الإثيلين اعتماداً على وجود Superoxide وتعمل مضادات الأكسدة المضافة على تثبيط هذا التحول. كذلك فإن المركبات عديدة الأمين يكون لها قدرة على تثبيط فعل الشوارد الحرة. ولى عملية التجريح مباشرة تثبيط سريع فى نمو الخلية وفقدان القطبية، لكن تستعيد الخلية تلك الخصائص عند غسل الجرح مما يؤكد وجود مواد مفرزة من الجرح تعطى هذا التأثير، ويعتمد ذلك على النوع النباتى (George, 1993).

٢. التأثير المشجع

وفى المقابل فإن للجروح تأثيرات إيجابية ويعزى ذلك إلى أن التجريح يستحث حركة الهرمونات الداخلية وانتقالها إلى مكان الجرح وذلك كأحد ميكانيكيات الدفاع والمقاومة ضد الأضرار الميكانيكية أو المسببات المرضية. وطبقاً لهذه النظرية يعتقد أن الكشف يتم عندما يحدث إتران بين منظمات النمو الداخلية والخارجية أى أن الجرح يضمن زيادة تركيز الهرمونات الداخلية فى هذه المنطقة للحد الضرورى للكشف. وتتضمن التأثيرات الإيجابية للجرح تكوين الكالس فبالرغم من أن المواد الناتجة من

التجريح تكون مثبطة في معظم الحالات إلا أن بعض النتائج أشارت إلى التأثير المشجع لها على تكوين الكالس. فعند حدوث جرح أو إعداد العقل تفرز بعض المواد في مكان القطع. يكون لها تأثير مشجع للنمو متمثلاً في تكوين الكالس أو نسيج الكامبيوم في مكان الجرح. ولوحظ أيضاً تأثير الحرح عند فصل الجزء النباتي وزراعته حيث يحدث انقسام للخلايا مؤدياً إلى تكوين الكالس. وكلما كانت مساحة السطح المقطوع أكبر كان ذلك ادعى لتكوين كمية أكبر من الكالس لذا يعتمد البعض إلى إحداث المزيد من التجريح للنسيج لإعطاء كالس أكبر. وربما يشجع التجريح تكشف الأشطاء فمن المعروف أن إحداث جرح في قاعدة الأشطاء قبل زراعتها من العوامل التي تساعد في تكون البراعم العرضية عليها، وغالباً يكون هناك ارتباط موجب بين التجريح وتكوين البراعم العرضية، مع ملاحظة أن ذلك لا يؤدي إلى زيادة معدل إمتصاص السييتوكينينات من البيئة.

كذلك فإن إحداث تجريح عرضي في العرق الوسطي لأوراق بعض النباتات مثل *Streptocarpus*, *Begonia*, *Saintpaulia* أدى إلى زيادة عدد البراعم المتكونة. وعند تنقيب أوراق هجين *Populua nigra x P. maximowiczii* بدبوس قبل زراعتها حدثت زيادة في عدد الأشطاء المتكونة، وكان أعلى معدل لها عند إحداث خمسة ثقوب في الورقة مع وضعها مقلوبة على سطح البيئة. وتكونت البراعم العرضية حول مناطق التجريح أما الأوراق غير المثقبة فتكونت عليها البراعم في مناطق القطع الخارجية فقط. وقد قام Phelan et al. (2007) بعمل جرح عرضي أو طولي على قواعد المستأصلات النباتية لأبصال *Tulbaghia violacea* قبل زراعتها وقد لاحظ أن معدل تكوين النباتات كان ٢.٤ وكانت نسبة النباتات ذات الأوراق المخططة عند عمل جرح عرضي ٣٥%، بينما كان معدل تكوين النباتات ٥.٢ ونسبة النباتات المخططة ٧١% عند عمل جرح طولي. ولم تكن البراعم الجانبية لنباتات تابعة لجنس *Opuntia* حساسة للسييتوكينينات أو الأوكسينات في البيئة لكن بإحداث تجريح في المستأصل النباتي حدثت استجابة لـ NAA

و BAP ونمت الأشرطة الجانبية (Lazcano *et al.*, 1997). كذلك فإن شق القمة النامية في بعض النباتات طويلاً إلى جزئين يؤدي إلى زيادة في نمو الأشرطة الجانبية. وكانت هذه المعاملات فعالة أيضاً في نباتات *Yucca galuca* بينما لم يكن لأي من هذه المعاملات تأثير في *Yucca elephantipes*.

الفصل الرابع

مراحل زراعة الأنسجة وبعض العوامل المؤثرة عليها

حدد Murashige ثلاث مراحل لعملية زراعة الأنسجة وقد لاقى هذا التقسيم قبولاً لدى المهتمين بعلم الإكثار الدقيق، لأنه لا يصف فقط مراحل زراعة الأنسجة لكنه يحدد النقاط التي يجب عندها تغيير ظروف النمو لتحقيق الهدف المرغوب من المزرعة. وبعد فترة من نشر Murashige هذا التقسيم تم إضافة مرحلتين جديدتين الأولى قبل تلك المراحل الثلاثة والأخرى في نهاية تلك المراحل فأصبح عددها خمسة. وتختلف الاحتياجات الضرورية لاستيفاء متطلبات كل مرحلة باختلاف نوع المزرعة ونوع النبات، وعوامل أخرى تتعلق بالنبات الأم والمستأصل النباتي. ويلاحظ أيضاً أن هذه المراحل قد تتداخل مع بعضها البعض وقد لا تتضح كل المراحل في بعض أنواع المزارع (George, 1993). ويبين شكل رقم (٤-١) مراحل إنتاج نباتات الخيار بزراعة الأنسجة كنموذج للإكثار المعمل، وتلك المراحل هي:

١. المرحلة الأولى: اختيار وتجهيز النبات الأم

وقد يطلق عليها مرحلة الإعداد وأيضاً المرحلة صفراء، فقبل البدء في زراعة الأنسجة يجب الاهتمام باختيار النبات الأم المستعمل كمصدر للمستأصل النباتي بدقة. فلا بد أن يكون النبات مطابق في صفاته للصفة أو النوع المراد إكثاره، وخالي من الأعراض المرضية المختلفة والإصابات الحشرية. وقد تتم معاملة النبات الأم أو الجزء المستعمل كمصدر للأنسجة في هذه المرحلة ببعض المعاملات التي تهدف إلى خفض التلوث الميكروبي أو تحسين النمو والتكشف في الخطوات التالية. فقد تُعامل النباتات ببعض المضادات الحيوية أو المبيدات الفطرية وسيتم توضيح ذلك في الفصل الخامس. ويشير (Leifert & Cassells, 2001) إلى أهمية إجراء اختبار معامل المرض لبعض مسببات المرضية. ولعل من الضروري مقاومة الحشرات لأنها ناقل أساسي للكثير

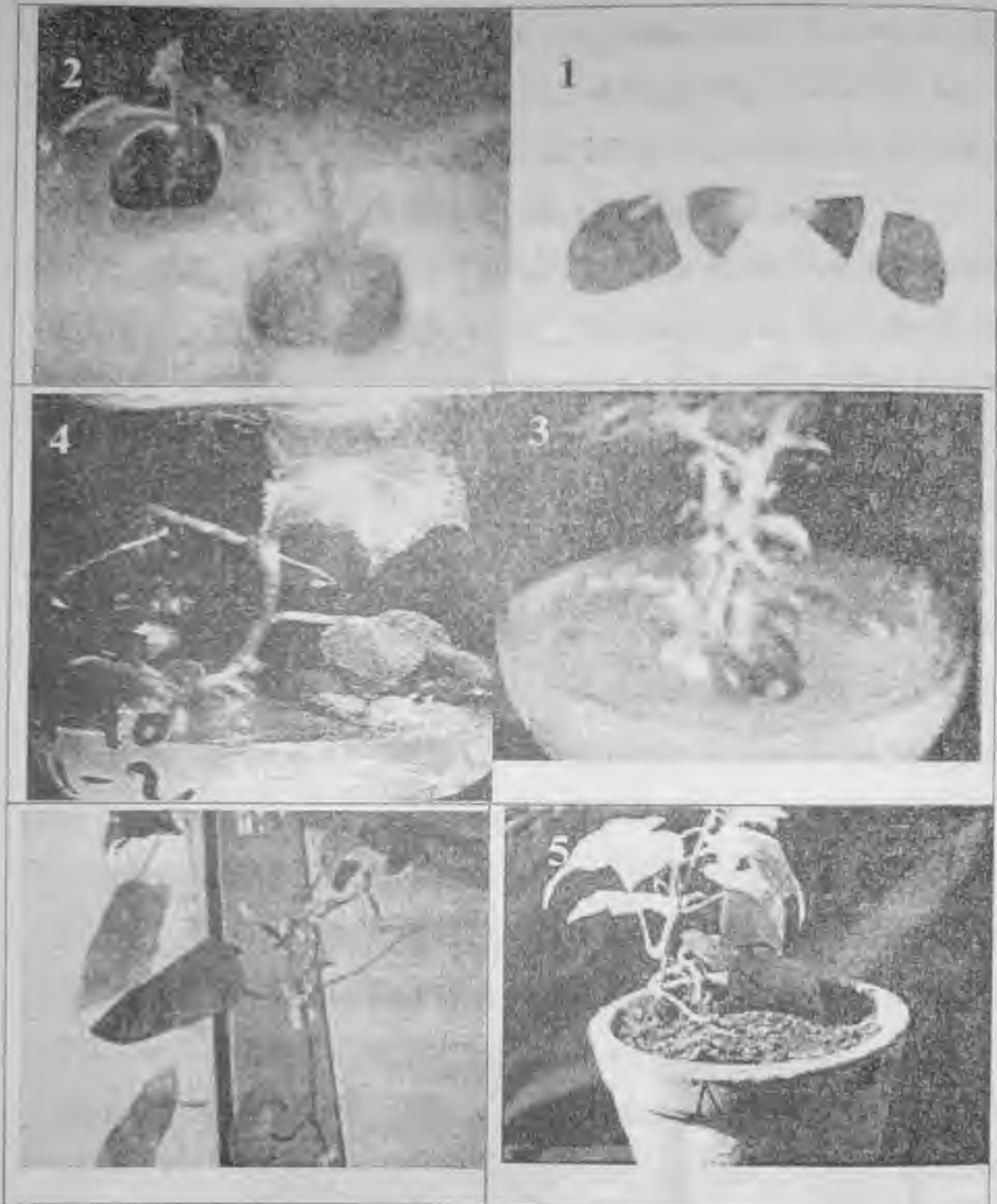
من الجراثيم وبعضها قد يضع البيض داخل أنسجة النبات ليفقس عقب تأسيس المزرعة والإعداد الحيد في هذه المرحلة يرفع من نسبة نجاح المزرعة ويقلل من تكاليف الإنتاج.

٢. المرحلة الثانية: تأسيس المزرعة المعقمة

بعد اختيار النسيج المناسب وإعداده الإعداد الجيد تأتي الخطوة التالية ذات الأهمية القصوى في زراعة الأنسجة ألا وهي عزل المُستأصل من النبات وتعقيمه تعقيماً سطحياً للتخلص من التلوث السطحي وبدون التأثير على حيوية النسيج. ثم ينقل المُستأصل إلى الوسط الغذائي الملائم الخالي من مظاهر التلوث. ويترتب على ذلك غالباً نمو المُستأصل النباتي بإحدى الصور المختلفة للنمو كالزيادة في الحجم أو تكوين الكالس أو الأجنة الجسدية. وأى نسيج أو بيئة تصاب بتلوث في هذه المرحلة يجب استبعاد الوعاء المحتوى عليه وتعقيمه قبل التخلص منه، وغالباً يمكن التحقق من وجود التلوث بعد ٣-٥ أيام من الزراعة. ويقاس نجاح هذه المرحلة بمدى الحصول على أنسجة غير ملوثة لها القدرة على مواصلة النمو. وسوف تناقش هذه المرحلة بالتفصيل في الفصل التالى.

٣. المرحلة الثالثة: استيلاء النباتات

الهدف من هذه المرحلة هو تكوين أفراد جديدة من المُستأصل النباتي أو ما يعرف باستيلاء نباتات جديدة. وهذه النباتات plantlets يمكن فصلها من المزرعة ونقلها إلى وسط جديد حيث تستمر في النمو وتعطى نباتاً كاملاً. وكما سبق الذكر في الفصل الأول تتعدد صور نشوء تلك النباتات فقد تكون أفرع تكشفت من براعم موجودة سابقاً على النبات الأم أو من براعم عرضية تكونت على المُستأصل النباتي. كما تتطور النباتات أيضاً من الأجنة الجسدية أو من البراعم المتكونة على الأجزاء الخضرية المخزنة للمواد الغذائية كدرينات البطاطس. وقد تستعمل النباتات المستولة كنسج يعاد زراعته للحصول على نباتات جديدة ويمكن تكرار ذلك عدد من المرات



شكل ١-٤: مراحل إنتاج نباتات الخيار باستعمال زراعة الأنسجة (١) مرحلة تأسيس المزرعة، (٢ و ٣) مرحلة استيلاء النباتات بتكوين البراعم العرضية، (٤) مرحلة الإعداد للنقل خارج المعمل، (٥) مرحلة أقلمة النباتات للظروف الطبيعية، (٦) نبات كامل مزهر بعد الأقلمة.

مالم يفقد المُستَصل قدرته على التَّكثُّف، وفي معظم الحالات تُقل بعض المُشكلات كإفراز المواد الفينولية التي قد تصادف زراعة النسيج الأول وتُسبب قُتل المزرعة. وسوف نتعرض للعوامل المؤثرة في هذه المرحلة في الأجزاء التالية من هذا الفصل.

٤. المرحلة الرابعة: الإعداد للنمو في الظروف الطبيعية

تكون النبيتات أو الأفرع الناتجة من المرحلة السابقة صغيرة الحجم ضعيفة التكوين وقدرتها على عملية البناء الضوئي وامتصاص الماء من التربة معدومة أو على الأقل منخفضة بشكل كبير. وليس لهذه النبيتات القدرة على النمو في الظروف الطبيعية في البيوت المحمية. لذا فإن هذه المرحلة تتضمن إعداد النبيتات لتحمل الظروف العادية والقيام بعملية البناء الضوئي. وقد تحتاج بعض النبيتات إلى معاملات خاصة، فمثلاً النبيتات التي لها دور سكون كمعظم الأبصال والكثير من الأشجار الخشبية يجب كسر سكونها سواء بالبرودة أو استعمال بعض منظمات النمو. وقد اقترح ضرورة تكوين الجذور أو منشأتها على الأفرع في هذه المرحلة قبل نقلها إلى خارج المعمل لأن تلك التي تكونت في المرحلة السابقة عادة غير عادية التركيب كما هو موضح بالشكل رقم (٤-٢) ولا تقوم بدورها الفسيولوجي. لكن على الرغم من هذا فإن تكوينها مؤثر جيد على إمكانية نجاح نقل النبيتات إلى خارج المعمل. وهذه العملية مهمة جداً كجزء من برنامج الإكثار الخضري الدقيق حيث تقدر تكاليف مرحلة تكوين الجذور بحوالى ٣٥-٧٥% من التكاليف الكلية لبرنامج الإكثار الدقيق (Debergh & Maene, 1981).



شكل ٤-٢: الجذور العرضية غير العادية في مزارع الأنسجة (على اليسار) والجذور العادية أثناء عملية الأقامة (على اليمين).

ولا يقتصر الأمر على تكوين الجذور بل من المهم أن يكون هناك ارتباط بين أوعية الخشب في الجذور والسوق. وتكون النباتات العشبية عموماً جذوراً بسهولة في برامج الإكثار الدقيق على العكس من الأشجار والشجيرات. وهناك بعض النباتات كالتين والطماطم تكون جذور دون الحاجة إلى تغيير في مكونات البيئة رغم احتوائها على السيتوكينينات فقط وبدون إجراء معاملات خاصة لتهيئها للتجذير. وإذا كانت المزرعة في شكل كتلة من الأشطاء فيجب عدم تقسيمها إلى أشطاء فردية إلا بعد تكوين الجذور. وفي بعض الحالات قد يفضل برنامج الإكثار تماماً لعدم تكوين جذور على النباتات الناتجة وبالتالي تموت النباتات عقب النقل من المعمل. وإن كانت النباتات الناتجة متقزمة فيجب دفعها للاستطالة باستخدام بعض منظمات النمو. وفي معظم الحالات يجب اتباع خطوات خاصة لدفع عملية التجذير.

ويتم دفع النباتات للتجذير بالمعاملة ببعض الأوكسينات أو نقل الأشطاء إلى بيئة ذات تركيز منخفض من الأملاح كاستعمال نصف أو ربع تركيز أملاح MS. كما يلعب تركيز الأجار والمكرفي البيئة وإضافة بعض المركبات عديدة الأمين دوراً في عملية التجذير. وقد تمت مقارنة تجذير أفرع نباتات *Syzygium alternifolium* في بيئة تحتوي على ٢% سكر و ٠.٨% أجار و ١ ملجم/لتر IBA واستعمل تركيز من أملاح MS يتراوح بين صفر والتركيز الكامل، وأشارت نتائج Sha Valli-Khan et al (1999) والموضحة بجدول رقم (٤-١) إلى تأثير ذلك على النسبة المئوية للتجذير وعدد الجذور وطولها. وقد لاحظ أهمية تركيز أملاح البيئة أثناء تكوين الجذور فلم تتكشف أي جذور في حالة عدم إضافتها فضلاً عن اصفرار الأوراق. وكان التركيز المنخفض منها وهو ربع MS أفضل من التركيزات الأعلى. كذلك كانت البيئة شبة الصلبة أفضل من البيئة السائلة لتكوين ونمو الجذور حيث زاد عدد الجذور والنسبة المئوية للتجذير وطول الجذر بزيادة تركيز الأجار من صفر إلى ٠.٨%، لكن انخفضت قيم قياسات جميع هذه الصفات بزيادة تركيز الأجار عن ٠.٨%. وكان أفضل تركيز

للسكر هو ٣% حيث زادت النسبة المئوية للتخدير وعدد الجذور ومتوسط طول الجذور المتكونة وزيادة طردية زيادة تركيز السكر من ١-٣% أما التركيزات الأعلى : ٥-٥% فقد أصعب تأثير سلبى على نمو النباتات.

جدول ١-٤: تأثير تركيز أملاح MS على تجدير أفرع نباتات *Synxium alternifolium* كما سجلها (Sha Valli-Khan et al. (1999).

تركيز أملاح MS	متوسط طول الجذور (سم)	عدد الجذور/ فرع	% التخدير
٠.٠٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠
٠.٢٥	١.٠	٣.٠	٦٦.٦
٠.٥٠	١.٤	٢.٨	٦٢.٥
٠.٧٥	٠.٨	١.٧	٥٥.٨
١.٠٠	١.٠	١.٣	٣٧.٥

ويشير (Arrebola et al. (1997 إلى إمكانية نقل الأشطاء المكتشفة في القوارير معمليا لنباتات *Isoplexis canariensis* إلى خارج المعمل بدون تكوين جذور وقد حصل على نسبة أقل من تصل إلى ١٠٠% باستبدال البيئة التي استعملها في أوعية الزراعة أثناء مرحلة التضاعف ببيت موس معقم وتم الري بالماء المعقم لمدة ٨ أسابيع. وقد حفظت المزرعة خلال هذه الفترة في نفس غرفة الزراعة لكن برفع الرطوبة النسبية إلى ٩٠-١٠٠%. نقلت الأشطاء بعد ذلك إلى صواني زراعة مملوءة بالبيت موس في البيت المحمي على درجة حرارة ٢٥° م ورطوبة نسبية ٥٠%. ثم نقلت الأشطاء بعد ذلك بصور فردية إلى أصص وكانت درجة الحرارة أثناء النهار ١٥° م وخلال الليل ٣° م والرطوبة النسبية ٤٠%. وفي بعض المعامل التجارية تتم عملية التجدير خارج المعمل عقب استطالة الأفرع وذلك لتقليل تكاليف الإنتاج. فعلى سبيل

المثال استطاع (Bhatia et al. (2002 الحصول على نسبة تجذير ١٠٠% عند الإكثار الدقيق لنبات *Stackhousia tryonii* بغمس قواعد العقل الطرفية بعد غسل البيئة العالقة عليها في محلول ٢ ملجم/لتر IBA ثم زراعتها في تربة مكونة من الرمل والبيرليت بنسبة ٤ : ١ وحفظها في غرفة مشبعة بالضباب ودرجة حرارة ٢٢° م لمدة أربعة أسابيع.

٥. المرحلة الخامسة: النقل للظروف الطبيعية

يعتبر نقل النباتات من المعمل إلى البيت المحمي أو الحقل وهو ما يعرف بالأقلمة *acclimatization* أو *adaptation* عنق الزجاجة في نجاح برنامج الإكثار الدقيق، ومن ثم سيتم الحديث عن هذه المرحلة وتأثير بعض العوامل المرتبطة بالظروف البيئية في مزارع الأنسجة عليها في الفصل التالي.

العوامل المؤثرة على النمو والتكشف في مزارع الأنسجة

من المعلوم أن بكل خلية نباتية مخزون من المعلومات الوراثية الخاصة بجميع الصفات المميزة للنبات، لكن في الظروف العادية لا يحدث تعبير لكل الجينات الموجودة في الخلية في ذات الوقت. ومن ضمن المعلومات الوراثية بالخلية تلك التي تمكن الخلية من أن تظل على صورة تطورية ظاهرية أو وظيفية محددة لعمر معين يطول أو يقصر حسبما تتغير الظروف المحفزة لعمل هذه الجينات. ويثير ذلك إلى أن الطرز المظهري للخلية أو النبات بصورة عامة هو عبارة عن التفاعل بين تركيبها الوراثي والعوامل البيئية. وعلى هذا يمكن لأي خلية تحت ظروف محددة تكوين نبات كامل حيث تعمل زراعة الأنسجة على استحداث الجينات المنوط بها دفع الخلية للتكشف وإعادة تكوين نبات كامل أو عضو مختلف كأن يتكون جذر من خلايا الورقة من التعبير عن نفسها. وهذا التحفيز قد يكون عن طريق عوامل طبيعية أو كيميائية، لكن من

الغريب أن الخلايا في نفس النسيج لا تستجيب بنفس الطريقة ويطلق على الخلية التي تستجيب لتلك المستحثات بـ *competent* أى مؤهلة.

لكن حتى الآن هناك صعوبة في دراسة لماذا هناك خلايا مؤهلة وأخرى غير مؤهلة حيث لا يمكن معرفة تلك الخلية إلا بعد استجابتها لمنظمات النمو وانقسامها لتتحول إلى صورة جديدة لا يمكن معها تحديد سبب استجابتها (Preece, 2008). وعلى هذا فإن فهم هذه الآلية عبر الدراسات الجزيئية قد يمكن من حل مشكلة دفع النباتات أو الخلايا التي عرفت بعدم استجابتها لزراعة الأنسجة. وغالباً يكون هذا التعبير ثابت في زراعة الأنسجة وينتقل من الأمهات إلى الأجيال الناتجة بالإكثار الخضري. لكن بالتكاثر الجنسي للنباتات الناتجة من زراعة الأنسجة فإن هذه الصفات التي تم التعبير عنها نتيجة تنشيط بعض الجينات تختفى مرة أخرى، ويطلق على هذا التنشيط المؤقت للجينوم بالوراثة فوقية *epigenetic*. ويعتبر ذلك لب عمليات الإكثار عموماً وزراعة الأنسجة على الأخص (Hartmann et al., 2002). ومن أمثلة الصفات التي أمكن تحفيزها معملياً والحفاظ عليها لمدة طويلة:

١. الصفات المظهرية المميزة لمرحلة النمو التي زرع فيها النسيج.
٢. التعبير عن الجنس في الأزهار.
٣. تحفيز الخلايا على تكوين نوع واحد من الأعضاء.
٤. قدرة الخلايا على النمو والتكشاف.
٥. عدم الحاجة إلى بعض الإضافات للبيئة مثل منظمات النمو فيما يعرف بـ *habituation*.

ومعظم صور التعبيرات الجينية يمكن أن تحفز أو تحور بتأثير المواد المضافة للبيئة خاصة منظمات النمو. وعلى هذا فإن الأنسجة التي تم تحديد وظيفتها أو شكلها بمعنى أنها تكشفت يمكن أن يعاد تكشفها مره أخرى إلى أعضاء جديدة أو تحولها إلى خلايا ميرستيمية أو كالس. لكن لو كانت الخلايا لا تملك تلك القدرة أو فقدتها - وهى من الاحتمالات الواردة أثناء زراعة الأنسجة أو إذا كانت الظروف البيئية غير ملائمة

فتبقى الخلية على حالتها السابقة دون تغيير، ويستمر النسيج في النمو على حالته السابقة كانه لم يفصل من النبات الأم. وقد تستمر قدرة الخلايا في النمو والتكيف هذه أحياناً في زراعة الأنسجة ثم تفقد الخلية تلك القدرة والتي قد ترجع إلى حدوث طفرات تعوق استمرار ذلك.

إن عملية النمو والتكيف في مزارع الأنسجة من العمليات المعقدة ويتحكم فيها العديد من العوامل. وتقسم هذه العوامل إلى عوامل وراثية، وهي بالطبع أهم العوامل فلو كان التركيب الوراثي لا يمتلك القدرة على النمو أو التكيف في زراعة الأنسجة فلن تنجح زراعة الأنسجة لهذا النبات تحت أى ظروف. وهناك العوامل المتعلقة بالظروف البيئية من حيث الوسط الغذائي المستعمل والظروف البيئية المحيطة بالمُستأصل النباتي. وقد انخرط الكثير من الدارسين لمزارع الأنسجة في دراسة تأثير منظمات النمو لما تحدثه من تأثير واضح وسريع على استحداث العوامل الوراثية لتتكيف الخلية. وبالطبع فإن هذه العوامل تتداخل مع بعضها البعض مما يزيد من صعوبة الوصول إلى التوليفة المثلى من تلك العناصر لإكثار بعض النباتات، وسوف يتناول هذا الفصل هذه العوامل بالتفصيل.

أولاً: العوامل الوراثية

كما سبق القول تتوقف الاستجابات المختلفة للأنسجة المنزرعة معملياً على التركيب الوراثي للنبات، بصفة أساسية. لكن من الخريب أنه يمكن استحداث بعض الخلايا في نفس النسيج بمعنى استلاكها لمستقبلات منظمات النمو المشجعة على ارتداد الخلية للحالة الميرستيمية على العكس من غيرها، وليس من المعلوم حتى الآن لماذا توجد تلك المستقبلات في خلايا دون غيرها (Preced, 2008). لكن الثابت أن معاملة تلك الخلايا بمنظمات النمو يدفعها لتخليق mRNA، وهو الكود الجيني من الأمثلة التي تؤكد استجابة زراعة أنسجة نوع معين أو صنف معين وربما سلالة دون صنف أو سلالة

أخرى شديدة الشبه بها، ويمكن الرجوع إلى المثال الذي ذكر عن الكشف في بعض سلالات الطماطم بالفصل الثالث لتوضيح مدى التباين بين السلالات المختلفة. وقد وجد (Lall et al., 2004) تباين في قدرة سلالتين من نبات الارابيدوسس على تكوين أسطح بالمقارنة مع الآباء لكن تم استعادة هذه القدرة في النسل الناتج من تهجين السلالتين معاً وذلك يعنى أن كلا السلالتين تمتلك جين معين يلعب دوراً في عملية الكشف. والجين مفقود في السلالة الأخرى وعند تهجين فإن جينوم النسل الناتج يحتوى على الجينين المسئولين عن الكشف. وتحليل الجينوم تم تحديد ثلاث مواقع جينية لصفة كمية على الكروموسومات رقم ١ و ٤ من أحد الآباء والثالث على كروموسوم رقم ٥ من الأب الآخر وكان أكثر تأثيراً في عملية الكشف.

وقد أرجعت الاستجابات الحادثة في زراعة الأنسجة والتي قد تورث كصفة كمية أو غير وصفية أحياناً إلى جينات نووية أو سيتوبلازمية (Decook et al., 2006 & Wan et al., 1988). وقد تم تحديد عدد من الجينات المنوط بها لتحكم في تكثر الأشطاء في نباتات الارابيدوسس منها (*cytokinin independent1* (CKI1) وعبر تعبير هذا الجين يمكن كشف الأشطاء من الكالس بدون إضافة السيتوكينين. ويعتقد أن ينسخ إلى بروتين مسئول عن مستقبلات السيتوكينين في الخلية، لكن الدراسات الفسيولوجية لم تؤكد ذلك. كذلك تم تعريف الجين ARR2 الذي يوجد في نواة نحر النبات وهو يحفز الخلية للاستجابة للسيتوكينين (Lall et al., 2004). وكأى صفة أخرى فإن هذه الصفات المتعلقة بالقدرة على النمو أو الكشف أو تكوين الكال في زراعة الأنسجة قد تكون سائدة سيادة تامة أو غير تامة أو متنحية أو لها تأثير إضافي كما يلعب التضاعف دوراً في الاستجابة فنباتات البطاطس ثنائية التضاعف تكون أشطاء بمعدل أعلى من تلك الرباعية (Gahan & George, 2008). تكون الكال الجينى عند زراعة الأجنة غير الناضجة لهجين *Vigna glabrescens* مع *radiate* لكن كان الكال الناتج من زراعة الأجنة الناتجة من التلقيح العكسي غير

جنينى (Chen et al., 1990). وعموماً للنباتات المونثة استجابة مختلفة عن المذكرة التابعة لنفس النوع وغالباً تكون ذات مقدرة أعلى على الكشف فى زراعة الأنسجة.

وقد سجل (Keyes et al. 1981) ارتباط بين معدل النمو فى القوارير وقوة النمو وبعض الصفات المحصولية للنباتات فى الحقل. وتشير هذه الدراسة إلى إمكانية الاعتماد على صفات النمو فى القوارير فى انتخاب الهجن التى تمتاز بقوة الهجين *hetrosis*. لكن على العكس من ذلك فعلى الرغم من النمو الجيد للكاس ونباتات الجيل الأول لهجين البيتونيا لم تسجل علاقة ثابتة بين النمو فى الحقل والقوارير. تمتاز بعض أنواع الكافور مثل *Eucalyptus grandis* و *E. urophylla* و *E. camaldulensis* بسهولة الإكثار باستعمال العقل الغضة أو بالإكثار الدقيق على العكس من بعض الأنواع المنتشرة فى المنطقة المعتدلة مثل *Eucalyptus globulus* و *E. nitens*. وقد سجل وجود علاقة بين اختلاف الطرز المظهرى للنباتات والذى يشير إلى وجود تباين وراثى وقدرتها على تكوين جذور والذى تراوح بين صفر و ١٠٠% فى القوارير (Willyams et al., 1992) وقد أشار إلى التحكم الوراثى فى الإكثار الدقيق لهجين *E. nitens x globulus*. ولدراسة صفة توريث تكوين الجذور فى القوارير لأشجار *E. globules* قام بدراسة تكوين الجذور لـ ٢٠ عشيرة مفتوحة التلقيح و ١٥ عشيرة منتخبة وقد تم تكرار اختبار التجذير فى سنتين. ونشر النتائج إلى التأثير العالى للجينات المضيفة فى نجاح التجذير.

وتلعب العوامل الوراثية دور هام فى هذه الاستجابات من خلال تفاعلها مع الظروف البيئية المختلفة. فعلى سبيل المثال قد يظهر صنف ما استجابة معينة كتكشف أشطاء عند زراعته فى تركيز معين من منظمات النمو أما الصنف الآخر فلا يظهر نفس الاستجابة إلا إذا كان نامياً فى تركيز مختلف أو باستخدام نوع آخر من منظمات النمو. فيمكن زراعة بعض أصناف القمح بنجاح فى عدة أنواع من البيئات لكن هناك

بعض الأصناف لا يمكن زراعتها تحت نفس الظروف. ولوحظ أيضاً في الرسم الحجازي أن بعض الأصناف ذات قدرة عالية على إنتاج الأجنة الجسدية بالمقارنة ببعض الأصناف الأخرى بصرف النظر عن البيئة المستعملة (Gahan & George, 2008). ونفس التأثير ينطبق على كل العوامل البيئة الأخرى، فعلى سبيل المثال قام (Tewary et al, 2000) بمقارنة نسبة تفتح البراعم الجانبية ونمو الأسطاء المتكونة لأربعة طرز وراثية مختلفة من التوت البري في بيئة MS ذات رقم هيدروجيني يتراوح بين ٥.٨ و ١٠. ويوضح جدول رقم (٤-٢) أن جميع الطرز الوراثية للنباتات Mulberry فشلت في النمو في بيئة ذات الرقم الهيدروجيني ١٠ وكانت استجابة الطرز الوراثية المختلفة متباينة ومعنوية للاختلاف في الرقم الهيدروجيني في الصفتين المدروستين. وبالإضافة إلى ذلك كان هناك تداخل معنوي بين تأثير التركيب الوراثي والرقم الهيدروجيني على هاتين الصفتين.

ويتضح دور التركيب الوراثي للنباتات في زراعة الأنسجة أثناء مراحلها المختلفة، ففي مرحلة تأسيس المزرعة وجد أن معدل نجاح واستمرار حيوية الأنسجة المنزرعة متباين بين الأصناف. فقد اختلفت قدرة القمم النامية على التكشف عقب الزراعة باختلاف الأشجار المأخوذة منها على الرغم من إنها من نفس الصنف ونامية تحت نفس ظروف النمو. كذلك فإن معدل تكوين الكالس وقوامه ولونه والصفات الأخرى المتعلقة به تتأثر بالتركيب الوراثي للنبات الأم. كذلك تتأثر مرحلة تكشف الأعضاء بالطريقة المباشرة من الأنسجة بالتركيب الوراثي فالنباتات التي لها القدرة على تكوين براعم عرضية على أوراقها مثل *Pepromia* و *Begonia* لها قدرة عالية على تكوين أسطاء على أنسجتها المنزرعة معملياً في وسط مناسب مقارنة بالأنواع الأخرى. وعموماً النباتات وحيدة الفلقة لها قدرة منخفضة على التكشف المباشر بالمقارنة مع النباتات ثنائية الفلقة، كذلك تعتبر النباتات التابعة للعائلة البقولية أقل قدرة على التكشف. لكن النباتات وحيدة الفلقة والتي تكون أوراق مخزنة للغذاء ذات قدرة

أعلى نسبياً على تكوين أشطاء، والنباتات المكونة لأبصال غالباً تعطى أشطاء عند زراعة الأجزاء القاعدية لأوراقها العصارية.

جدول ٤-٢: تأثير التركيب الوراثي والرقم الهيدروجيني للبيئة على تفتح براعم ونمو أشطاء نبات Mulberry المنزرعة في بيئة MS كما أوضحها (Tewary et al. (2000.

الرقم التجريبى	التركيب الوراثي							
	G2		G3		G4		S34	
	طول للتنفتح (سم)	% للتنفتح	طول للتنفتح (سم)	% للتنفتح	طول للتنفتح (سم)	% للتنفتح	طول للتنفتح (سم)	% للتنفتح
٥.٨	٨٥.٦	٣.٨	٧٥.٦	٣.٧	٧٠.٦	٤.٣	٧٨.٠	٦.٦
٨.٥	٧٦.٦	١.٥	٥٠.٣	٠.٦	٣٨.٨	٢.٨	٧٣.٣	٣.٠
٩.٠	٦٦.٦	١.٣	٣٥.٠	٠.٤	٣٠.٣	١.٩	٦١.١	٢.٠
٩.٥	٤٠.٣	٠.٧	٣٠.٣	٠.٢	١٥.٣	١.٥	٣٦.٠	١.٧
١٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠

يعتمد الكشف غير المباشر على وجود الكالس، وتباين سرعة نمو وتكوين الكالس وقدرته على الكشف بين الأنواع المختلفة. لكن لا توجد علاقة ثابتة بين معدل تكوين ونمو الكالس والقدرة على الكشف. وبالتالي قد تكون نفس الجينات المسؤولة عن هذه الصفات واقعة تحت تأثير جينات مستقلة. وقد أمكن تحديد العديد من الجينات المسؤولة عن الاستجابات المختلفة في الأنسجة المنزرعة معملياً. وفي بعض الحالات وجد أن هناك ارتباطاً بين سرعة النمو في زراعة الأنسجة والصفات المحصولية والنمو في الحقل، مما يساعد في تصميم برامج الانتخاب المبكر لهذه النباتات.

ثانياً: العوامل المتعلقة بالنبات الأم

تتعدد صور تأثير النبات الأم على الأنسجة المنزرعة معملياً ويمكن توضيح

ذلك فيما يلي:

١. مرحلة النمو والتطور

يمر النبات بمرحلتين محددتين في تطوره عقب تكوين الزيجوت وحتى الوصول إلى مرحلة البلوغ وهو ما يعرف بـ *ontogeny* أو *ontogenesis*. وتسمى المرحلة الأولى التي تكون عقب الإنبات بطور الصبا أو *juvenile stage*، أما المرحلة التالية وهي مرحلة النضج والقدرة على التكاثر الجنسي فتسمى بمرحلة البلوغ *maturity stage*. ومن الصعب إيجاد طريقة لدفع النبات إلى الأزهار في مرحلة الصبا وقبل الوصول إلى مرحلة البلوغ. ويتم التعبير عن أى من الطورين بعدد من الجينات ذات التعبير الثابت في الخلايا الميرستيمية في القمم النامية. وبانقسام تلك الخلايا ينتقل هذا التعبير إلى الخلايا الجديدة وبالتالي عبر التكاثر الخضري حيث يمكن الاحتفاظ بهذا التعبير لمدة طويلة أو قصيرة على أساس الظروف البيئية. ولكل مرحلة من مراحل النمو صفات ظاهرية أو وظيفية تميزها عن الأخرى، وقد تكون الفروق بين المرحلتين واضحة أو متداخلة. ففي طور البادرة تكون هناك صفات ظاهرية أو وظيفية تختلف تماماً عن تلك الموجودة في النبات البالغ، لكن قد يكون من الصعب تحديد النقطة الانتقالية بين الطورين، فقد يحدث تغيير تدريجي في بعض أو كل هذه الصفات بدخول النبات مرحلة البلوغ.

هذا وتختلف مدة كل طور باختلاف الأنواع النباتية، ففي الأشجار يستمر طور الصبا فترة طويلة تصل إلى عدة سنوات أما في العشبيات فإن مدة هذا الطور تكون أقصر بكثير، والنباتات ذات الحولين بالطبع لها طور صبا أطول من الحوليات. كذلك تتباين الصفات الظاهرية المحددة لكل طور باختلاف الأنواع النباتية وتتضمن تغيير في

شكل الورقة وتركيبها، لون الأوراق، نوع الكيوتيكل، وجود الأشواك، زاوية نمو الأفرع، طول السلاميات وغيرها من الصفات المختلفة باختلاف الأنواع. وأغلب النباتات في مرحلة الصبا لها قدرة عالية على تكوين جذور على العقل علاوة على قلة إفراز المواد الفينولية، ويجب أن تؤخذ تلك الاعتبارات في الحسبان أثناء الإكثار الدقيق. وقد تؤدي زراعة الأنسجة إلى تحول النباتات من طور الصبا إلى طور البلوغ، ويفسر ذلك في المخروطيات بقلة المجموع الجذري المتكون في النباتات الناتجة معملياً عن تلك الناتجة من البذور. وهناك بعض المعاملات تُتبع لدفع النبات إلى التحول مرة أخرى إلى طور الصبا. ولما كانت النباتات التي في مرحلة الصبا ذات صفات مفضلة للإكثار الدقيق ومحددة لنجاح زراعة الأنسجة من حيث قدرتها على تكوين الجذور، الأشرطة وكذلك الأجنة الجسدية (George, 1993).

لكن ليس من الضروري كما تشير الكثير من الأبحاث أن تقل القدرة على التكشف عموماً وتكشف الجذور بالتحديد في مزارع الأنسجة وباستعمال وسط نمو محدد بوصول النباتات مرحلة البلوغ. وغالباً يتم ذلك باستعمال بيئات غنية في السيتوكينينات التي من شأنها تحفيز عودة الخلايا إلى طور الصبا. وهذا ما وصل إليه Monteuuisin (2004) فقد قام بزراعة العقل الساقية من أشجار *Acacia mangium* في طورى البلوغ والصبا لمدة ثلاث سنوات بهدف تنشيط نمو البراعم العرضية. وبالرغم من المعدل الأعلى لتكوين الجذور والأشرطة للمستأصلات في طور الصبا (٥.٥ فرع/مستأصل) ونسبة تجذير ٩٠% في مقابل ٣.٩ فرع/مستأصل ونسبة تجذير ٧٧% للمستأصلات المأخوذة من أمهات في طور البلوغ، فإنه الفرق لم يكن معنوياً. لكن كان تأثير الظلام وتركيز الأملاح بالبيئة أهمية في التجذير حتى في حالة استخدام أمهات في طور الصبا. وربما يرجع ذلك إلى اختلافات في أيض المركبات المختلفة باختلاف طور النمو. ويضيف (Ballester et al., 1999) أن السبب في نقص القدرة على التجذير في مرحلة البلوغ إنما يرجع إلى تغير في التركيب التشريحي. وفي

دراسة لأشجار *Castanea sati* يبلغ عمرها ٨٠ سنة تبين عدم وجود اختلاف جوهري في القطاع العرضي للسيقان المأخوذة من التاج أو من الأفرع التي نمت في قاعدة الجذع وهي تصنف على أنها في طور الصبا. وأمكن دفع الخلايا في كلا النوعين إلى الانقسام بعد فترة وجيزة من المعاملة بالأوكسينات إلا أن تكوين المبادئ الميرستيمية للجذور تم في السيقان الأحدث بعد ثلاثة أيام من المعاملة وتكون الجذر بالفعل بعدد عشرة أيام. لكن رغم انقسام الكامبيوم في الأنسجة البالغة لم تتكون المبادئ الميرستيمية للجذور وذلك على الرغم من ارتفاع محتوى تلك الأنسجة من IAA وكذلك المركبات عديدة الأمين. ومن العوامل التي تستخدم في مزارع الأنسجة حتى تستعيد النباتات مرحلة الصبا (rejuvenation)

أ. الاستطالة الإظلامية: من المعروف أن الإضاءة المنخفضة أو الظلام يؤديان إلى استطالة الأفرع وشحوب لونها Etiolation، وتكون الأوراق المتكونة صغيرة الحجم وغير كاملة الانبساط. وتستعمل هذه الظاهرة في زراعة الأنسجة للتخلص من بعض مسببات المرضية، وقد تكون الاستطالة ضرورية لسهولة تقسيم الساق إلى عدد من العقد لاستخدامها في الإكثار. وتعمل هذه الظاهرة على تحول القمم الميرستيمية من النباتات المأخوذة في طور البلوغ إلى طور الصبا. وفي دراسة لإكثار المانجو في القوارير وجد (Krishna et al. (2008 أن عمر نباتات المانجو الأم يلعب دور هام في الاستجابة لزراعة القوارير. واختلف معدل بقاء الأنسجة حية عقب الزراعة على أساس الحالة الفسيولوجية والتي ترتبط بدورها بالتطور في عمر النبات وبالرغم من اعتبار كلا المصدرين صغير العمر إلا أن النباتات التي نمت في البيت المحمي كانت تبدو من النظرة الفسيولوجية ومحتوى النباتات في المركبات الثانوية أصغر من تلك في الحقل المفتوح وبالتالي كانت استجابتها أفضل. حيث فشلت المستأصلات التي كان مصدرها الحقل في النمو عقب الزراعة. وقد أضاف أن تلقيح النباتات في الحقل بفطريات mycorrhiza يحسن من استجابتها في

زراعة الأنسجة باعتبار أن تلك الفطريات تلعب دوراً في زيادة تحمل النباتات للإجهاد ومنه زراعة الأنسجة، إلا أن ذلك يحتاج إلى مزيد من الأبحاث. وقد قام بمقارنة محتوى المُستأصلات النباتية للنبات النامية بالحقل من المواد الفينولية وتأثيرها على استجابتها في القوارير وكيفية التغلب على ذلك باستخدام الاستطالة الإظلامية حيث تم تغطية السيقان الحديثة سريعة النمو بأكياس سوداء اللون لمدة أسبوع قبل استعمالها للزراعة، أو معاملة النسيج بإضافة مضادات الأكسدة. وكان لمنع الضوء عن المُستأصلات النباتية تأثير واضح في خفض محتواها من المواد الفينولية نتيجة نقص الإنزيمات المسنولة عن ذلك وبالتالي تقليل موت الأنسجة عقب الزراعة.

ولتوضيح أثر الإظلام على مراحل زراعة الأنسجة المختلفة قام Karam & Al-Majathoub (2000) بتنمية أبصال *Cyclamen persicum* في بيئة رطبة في الظلام أو تحت إضاءة للحصول على أعناق الأوراق واستعمالها للإكثار الدقيق. وأشارت النتائج إلى انخفاض معنوي في نسبة التلوث الداخلي بالكائنات الدقيقة عند استعمال الأجزاء المستطيلة إظلامياً. وأضاف أيضاً أن نسبة الأجزاء المكونة للأشطاء كانت ٣٢% ومتوسط عدد الأشطاء ٠.٨٦ لكل مُستأصل نباتي مقابل ٧% وكان متوسط عدد الأشطاء ٠.١٦ لكل مُستأصل نباتي مأخوذ من النباتات النامية في الضوء. أما الأشطاء النامية في الظلام فكان وزن وحجم الكالس المتكون منها بعد ٨ أسابيع هو ٠.٣ جم (١.٤٠ سم^٢) مقابل ٠.٠٢ جم، (٠.٠٣ سم^٢) للأشطاء النامية في الضوء على التوالي. وكذلك تبين وجود تداخل بين ظروف الإظلام والمعاملة بمنظم النمو TDZ، ولعل هذا يرجع إلى انخفاض مستوى IAA الداخلي نتيجة الظلام.

ب. **التقليم:** تجدر الإشارة إلى أن التقليم الجائر للأشجار يحفز تكوين أفرع جديدة على الجذع وفي قاعدة الساق وتتسم هذه الأفرع بعلامات طور الصبا. وقد تمكن

(2005) Rathore et al. من الإكثار الدقيق لأشجار *Citrus limon* المسنة بعد تقليم الأفرع في الخريف واستعملت الأفرع حديثة النمو في الشتاء كمصدر للعقد الساقية للزراعة في القوارير وتمكنت الأشطاء المتكشفة من تكوين الجذور. ولعل السبب يرجع إلى حدوث تغيير في نسبة منظمات النمو والمركبات الأخرى في الأفرع حديثة النمو عقب التقليم.

ج. التطعيم: من الثابت ارتباط ضعف تكوين الجذور على العقل بدخول النبات في طور البلوغ ويمكن بتطعيم البراعم أو العقل الساقية المستأصلة من الأشجار البالغة على بادرات حديثة النمو استرداد تلك العقل القدرة على تكوين الجذور طبقاً لما هو معروف من تأثير الأصل على الطعم. ويعتبر النجاح في هذا من التطبيقات العملية لزراعة الأنسجة فالكثير من الأشجار غير نقية التركيب الوراثي ولا تثمر أو تتضح قيمتها الاقتصادية إلا بعد فترة قد تصل إلى سنوات وعندها تكون فقدت القدرة على التكاثر الخضري. وعلى الرغم من نجاح (2006) Chabukswar et al. في دفع المستأصلات النباتية لأشجار *Garcinia indica* عمرها ٢٠ عام من تكوين براعم عرضية واستطالة تلك الأفرع إلا أنه كان من الصعب دفع تلك الأشطاء إلى التجذير. وللتغلب على ذلك قام بتطعيم عقل ساقية من الأشجار البالغة على بادرات حديثة الإنبات وقد لاحظ تكوين الكالس في منطقة التحام الأصل مع الطعم مما يشير إلى نجاح التطعيم. وبعد شهرين تقريباً قام بفصل البرعم الطرفي وأعاد تطعيمه على بادرات جدية وبتكرار ذلك خمس مرات أصبح بمقدرة العقل تكوين الجذور. تمكن (1996a & b) Revilla et al. من استرداد طور الصبا المتمثل في مقدرة العقل على تكوين مجموع جذري ونمو البراعم الجانبية لصنف الزيتون *Arbequina*. بتطعيم العقل الطرفية بطول ١ سم مأخوذة من أمهات مسنة على أفرع في طور الصبا تم الحصول عليها من إنبات الأجنة في المعمل ثم إكثار الأفرع الناتجة بالعقل الساقية. وبالمثل استردت أفرع أشجار *Sequoia sempervirens*

طور الصبا من حيث قوة النمو وتكوين الجذور على العقل عند تطعيم عقل طرفية بطول ١.٥ سم على سيقان حديثة النمو فى القوارير وتكرار التطعيم أربع مرات. وكانت قوة نمو النباتات الناتجة تعادل أو تزيد النباتات النامية من البنور وقد صاحب ذلك تغير فى بروتين الأوراق (Huang et al., 1992).

د. منظمات النمو: إن معاملة النباتات البالغة بمنظمات النمو وخاصة السيتوكينينات عن طريق الحقن أو الرش يؤدي إلى الارتداد جزئياً أو كلياً إلى طور الصبا وامتد تأثير هذه المعاملة إلى عدد الأفرع المتكشفة (George, 1993). وتزيد فاعلية هذه الطريقة عندما يتم تطبيقها مع معاملات الظلام. وقد استردت المستأصلات المأخوذة من أشجار *Frazinus angustifolia* البالغة طور الصبا عندما وضع Perez-Parron et al. (1994). العقل الساقية فى ماء مقطر مضاف إليه ٤.٤ ملليمول من BA و ٥.٤ ملليمول من NAA و ١٤.٤ ملليمول من GA₃. وبالفعل تم تأكيد دور الهرمونات وخاصة السيتوكينينات فى مراحل التطور للأشجار وكانت النسبة بين *isopentenyladenine-type*² (iP-type) و *zeatin-type* (Z-type) فى أشجار *Pinus radiata* ذات أهمية فى تحول الأشجار لطور البلوغ وذلك بتقدير محتوى العقل الطرفية من نباتات بالغة ومحتوى نفس العقل بعد تطعيمها على نباتات فى مرحلة الصبا، وقد سجل انخفاض فى محتوى السيتوكينينات بدخول الأشجار مرحلة البلوغ (Valdés et al., 2003).

هـ. الحرارة العالية: تعمل الحرارة العالية عن المعدل الطبيعي على تشجيع تكوين أفرع ذات صفات الصبا من النباتات البالغة وقد أورد (Preece 2008) عدة أمثلة ناجحة لذلك لكن دون تفسير واضح لفعل الحرارة.

ويتضح مما سبق تأثير طور النمو على مزارع الأنسجة فى مرحلتى التأسيس والنمو التكشف. وتعد الأنسجة الميرستيمية كنسيج الكامبيوم من الأنسجة التى يمكن

استعمالها لإنتاج مزارع ذات قدرة عالية على الكشف من الأشجار المسنة، أما تأسيس المزرعة باستعمال القمم الساقية للأشجار المسنة فهي عملية صعبة وغير ناجحة في معظم الحالات. ومن الصعوبات التي تحول دون استخدام الأنسجة البالغة هو إفرازها لمواد فينولية والتي تسبب تسمم للنسيج وتغير لون البيئة إلى اللون الأسود أو البني، أما الأفرع في طور الصبا يقل إفرازها لهذه المواد. وفضلاً عن صعوبة استعمال الأنسجة المسنة كمصدر للزراعة فإن معدل نموها وتكثفها يكون منخفض. أما أنسجة الزيجوت والأجزاء المأخوذة من البادرات الحديثة الإنبات فلها قدرة عالية على الكشف والتجدير وتكوين الكالس.

٢. تأثير الجنس

من المتوقع أن يكون هناك تأثير للجنس على زراعة النباتات في القوارير لارتباط ذلك بالمحتوى الهرموني للنبات والأحماض الأمينية والبروتينات والعديد من نواتج الأيض (Prakash et al., 2003). ومن ثم أشار Llorente & Apostolo (1998) إلى التباين في تأثير منظمات النمو في الإكثار الدقيق على أساس جنس أشجار *Simmondsia chinensis* وقد تبين بالفعل التباين في القدرة على الكشف بين النباتات المذكرة والمؤنثة في بعض النباتات أحادية الجنس. لكن لم يلاحظ Welander & Negash (2005) فرق بين الأشجار المذكرة والمؤنثة *Hagenia abyssinica* ونظراً لصعوبة التفريق بين النباتات المذكرة والمؤنثة في العديد من النباتات فإن تحديد طريقة مثلى لإكثار النباتات المؤنثة ستساهم بلا شك في إنتاج نباتات ذات فائدة اقتصادية. ولدراسة تأثير جنس النبات المستخدم على تكشف الأشرطة من البراعم الجانبية لخمسة طرز وراثية من نبات الهوهوبا، قام Tyagi & Prakash (2004) بزراعة عقد الساقية من نباتات مذكرة وأخرى مؤنثة في بيئة MS محتوية على تركيزات مختلفة من BA. وتشير النتائج المبينة في جدول رقم (٤-٣) إلى اختلاف استجابة الطرز الوراثية، كما

تباين عدد الأشرطة المتكشفة من كل جزء نباتي على حسب جنس النبات الأم، وكان أعلى عدد للأشرطة وهو ١٠ لكل جزء نباتي عند زراعة أجزاء من النباتات المذكورة للطراز الوراثي EC 99692 في بيئة محتوية على ١٠ ملجم لكل لتر من BA و ٩.٣ لكل جزء نباتي عند زراعة أجزاء من النباتات المؤنثة للطرز الوراثي EC 171284. وأوضحت الدراسة أيضاً إلى أن المحتوى العالي من السيتوكينينات في النباتات المذكورة قد يكون هو سبب استجابتها العالية بالمقارنة مع النباتات المؤنثة مع الأخذ في الاعتبار الفروق بين الطرز الوراثية المختلفة.

جدول ٤-٣: تأثير جنس النبات والتركيب الوراثي و BA على تكشف الأشرطة من العقد الساقية لنبات الهوهوبا (Tyagi & Prakash, 2004).

التركيب الوراثي	BA (ملجم/لتر)							
	٠	٢	٥	١٠	٠	٢	٥	١٠
	النباتات المذكرة				النباتات المؤنثة			
EC99690	٢.٣	١.٨	٥.٦	٥.٠	٢.٠	٢.٧	٤.٦	٣.٤
EC99691	١.٧	٤.٦	٥.٥	٣.٠	٢.٤	٣.٤	٥.٠	٨.٧
EC99692	٢.٢	٤.٧	٣.٧	٧.٤	٣.٠	٤.٧	٥.٣	١٠.٠
EC171284	١.٦	٦.١	٦.٠	٩.٣	٢.٥	٢.٠	٣.٧	٧.٠
EC267779	٢.٥	٦.٣	٤.٢	٤.٦	٢.٠	٥.٢	٨.٢	٦.٥

لكن في معظم الحالات تستجيب النباتات المؤنثة بصورة أفضل من المذكرة. وعلى الرغم من العديد من الدراسات التي اهتمت بدراسة إكثار أشجار الهوهوبا المذكرة والمؤنثة فهناك تعارض في إمكانية تحديد بعض المؤشرات للتفريق بين جنس النبات في المراحل الأولى من النمو في مزارع الأنسجة. ويبين Prakash et al.

(2003) وجود تباين في استجابة العقد الساقية من كلا الجنسين للنمو والتفرع في القوارير باختلاف الأملاح المعدنية في البيئة، وحتى لتركيز الفحم المنشط و PVP الذي استخدم للتغلب على المواد الفينولية. وقد خلصت الدراسة إلى إمكانية استعمال وسط MS المضاف إليها ٥% من لبن جوز الهند أو ٠.٠٠٥، ٠.٠٢٥، ٠.٠٥، ٠.٠٧٥، ٠.١ ملليمول من PVP لتحديد جنس النباتات في السلالة ٣٣١٩٨ من الهوهوبا. وفي استعراضه للدراسات الأخرى في هذا الصدد أشار إلى وجود اختلاف في محتوى الأوراق والأزهار من الفينولات على العكس من إنزيم البيروكسيداز والبروتين الكلي. أما الكالس المتكون من نباتات *Actinidia deliciosa* المذكورة فقد احتوى على ضعف تركيز الإنزيم السابق بالمقارنة مع كالس النباتات المؤنثة.

٣. معاملة النبات الأم والأجزاء المفصولة قبل التعقيم

تتوقف التطورات التي تحدث للنسيج عقب الزراعة على الحالة الفسيولوجية للنسيج والتي بدون شك ترتبط بالمعاملات التي تتم للنباتات مصدر المُستأصل النباتي، وكذلك الظروف البيئية المحيطة. وفي معظم التجارب كان أحسن جزء نباتي هو المأخوذ من نباتات خالية من الأمراض والإصابات الحشرية. وأى نباتات مصابة بمرض يجب التخلص منها إلا إذا كانت هناك ضرورة قصوى لذلك. لأن هذا النسيج يموت غالباً وإن نجحت زراعته فهناك نسبة عالية من احتمال انتقال المرض إلى النباتات الناتجة والتي يكون عددها قليل وحجمها أصغر مقارنة مع تلك المكتشفة من الأنسجة السليمة، ويتوقف ذلك على نوع المسبب المرضي والعائل. وفي حالة حدوث تلوث داخلي لابد من إتباع الطرق الموصى بها للتغلب عليه كالمعاملة بالمضادات الحيوية أو المطهرات السطحية. وسيتم توضيح ذلك بالتفصيل عند الحديث عن تأسيس المزرعة في الفصل التالي. وبصور عامة لا يفضل استعمال النباتات النامية في الحقل المفتوح لأنها أكثر عرضة للتلوث، علاوة على صعوبة التحكم في العوامل المختلفة

التي تؤثر في النمو. ومن الناحية التطبيقية فإن النباتات العشبية يمكن تنميتها في ظروف متحكم فيها على العكس من الأشجار. وإن كان من الضروري الاعتماد على الأشجار المسنة لكونها نادرة مثلاً أو ذات طرز وراثية مفضلة فتؤخذ العقل وتزرع للحصول على أفرع حديثة تستخدم براعمها الجانبية للإكثار الدقيق. ويعاب على هذه الطريقة طول المدة التي تمر من أخذ العقل حتى إمكانية الحصول على البراعم الجانبية وتقدر هذه المدة في بعض هجن الكافور بـ ٨-١٢ شهر.

ولما كانت معظم الأشجار تنمو في مناطق بعيدة عن معامل الإكثار الدقيق فإن الأجزاء المفصولة قد يصيبها الذبول. كما تزيد نسبة حدوث التلوث الداخلي خلال الـ ٧٢ ساعة التالية للفصل وقبل تعقيم وزراعة الأجزاء المفصولة. وقد قام Watt et al. (2003) بمقارنة نقل الأجزاء المنتخبة للزراعة وهي عبارة عن عقل بها برعم واحد أو ثلاث براعم من أشجار *Eucalyptus grandis* النامية في البيت المحمي بعد معاملتها ببعض المضادات الفطرية إلى المعمل. وقد تم تغليف العقل في البولي إثيلين أو زرعت في زجاجات زراعة محتوية على ٣-٤ جم فيرموكيوليت معقم ومبلل بالماء. وكانت نسبة التلوث مرتفعة تصل إلى ٥٠-٥٧% عند لف الأجزاء النباتية في البولي إثيلين مقارنة بالطريقة الأخرى. كذلك كانت نسبة تفتح البراعم في حال استعمال زجاجات الزراعة ٥١-٥٥% على حسب طول العقلة مقابل ٢٠-٣٤% في حالة استعمال البولي إثيلين. وفي نفس الدراسة قام الباحث بفصل أفرع تحتوي على برعم طرفي وبطول حوالي ١٠٠ مم. ثم قُسمت الأفرع لنوعين من العقل الأول طولها ٢٠-٣٥ مم عبارة عن برعم واحد في إبط ورقة تم إزالة نصفها العلوي. أما النوع الثاني فكان عقل طولها ٣٥-٥٠ مم بها ثلاث براعم وتم إزالة جميع الأوراق من عليها. ورشت الأجزاء المفصولة بالماء المقطر المعقم أو بالكحول ٧٠% وحفظت في زجاجات الزراعة أو في البولي إثيلين لمدة ٤٨ ساعة على درجة حرارة ٢٤-٢٦°م في الظلام. وأعقب ذلك إجراء التعقيم السطحي والزراعة في بيئة الإكثار. وتوضح النتائج المدونة في جدول

رقم (٤-٤) أثر المعاملات السابقة على تلوث المزرعة فى مراحل نموها المختلفة وتفتح البراعم وعدد الأشطاء المتكونة. وتشير النتائج إلى انخفاض معنوى فى نسبة التلوث وزيادة عدد الأشطاء المتكشفة من الجزء النباتى برش الأجزاء المفصولة بالكحول ونقلها إلى المعمل فى أوعية محتوية على فيرموكيوليت معقم.

وهناك كثير من الأبحاث التى تشير إلى تأثير معاملة النبات المصدر ببعض المعاملات لتشجيع التكشف، فمثلاً سجلت زيادة فى عدد الأشطاء المتكشفة عند معاملة نباتات الفاصوليا التى استعملت كمصدر للأجزاء النباتية أثناء مرحلة إنبات البذور بمنظمات النمو BA و CPPU و TDZ. وأشار البعض إلى دور السيبتوكينيئات فى هذه المرحلة فى حث انقسام الخلايا المؤهلة للتكشف. وكان تأثير المعاملات مقتصر على الأجزاء المكونة للبذور وليس على الأوراق التى تتكون لاحقاً.

٤. الظروف البيئية التى ينمو فيها النبات الأم

يتم التحكم فى النمو بعدد من العوامل الداخلية التى ترتبط بدون شك بالعوامل الخارجية. فهناك ارتباط بين تغذية وري النبات الأم والحالة الفسيولوجية للنسيج وبالتالي استجابة المستأصل النباتى، حيث تؤثر التغذية والرى فى مدى تركيز العناصر الغذائية ومنظمات النمو فى الأنسجة النباتية. وقد أدى تغيير معدل السبب بالأسمدة المختلفة وخاصة النتروجينية إلى تغيير الاستجابة الحادة للنسيج المزروع. والتعامل الآخر الذى يتداخل مع تغذية وري النبات الأم هو ميعاد أخذ النسيج. فمن الطبيعى أن الإجهاد المائى ودرجات الحرارة وطول الفترة الضوئية وشدةها والطول الموجى تتغير على مدار العام وربما فى اليوم الواحد. ويؤدى هذا التغيير إلى اختلاف فى محتوى النبات الأم وأنسجتها من منشطات ومثبطات النمو والمواد الكربوهيدراتية والنتروجينية، كما يؤثر أيضاً على معدل حدوث التلوث المرضى الموجود بالنسيج. ومن هذا يتضح أن التوليفة المثلى من العوامل البيئية التى ينمو فيها النبات الأم خاصة

النامية بالحقل والتي تساعد على النمو والتكشف في زراعة الأنسجة متباينة ومتداخلة مع بعضها ومن الصعب التحكم فيها. لذا يفضل أن تؤسس المزرعة من نباتات تنمو تحت ظروف المعمل (George, 1993).

جدول ٤-٤: تأثير نوع المُستأصل النباتي لأشجار *Eucalyptus grandis* وبعض المعاملات قبل التعقيم على استجابته للإكثار الدقيق (Watt et al., 2003).

المُستأصل المعاملة**		مرحلة تفتح البراعم		مرحلة الإكثار		النباتى*	

بادرات حديثة الإنبات أو نباتات بالغة لأشجار *Quercus euboica* حيث شاهد اختلاف فى قدرة البراعم المفصولة فى شهور مختلفة من أمهات بالغة أو بادرات حديثة الإنبات فى البيت المحمى على تكشف الأشطاء فى القوارير (جدول رقم ٤-٥). كما بين وجود تداخل بين العمر وميعاد أخذ المُستأصلات، بينما لم يكن هناك تأثير لتوقيت أخذ المُستأصلات أو عمر الإنبات الأم على عدد الأشطاء المتكشفة. وتشير كثير من الأبحاث إلى أن الأجزاء المأخوذة عند بداية موسم النمو أو أثناء موسم النمو غالباً ما تكون ذات قدرة أعلى على النمو من تلك المأخوذة فى نهاية موسم النمو. لكن استنتج Lardet et al. (1998) أن هناك قدرة عالية لبراعم أشجار *Hevea brasiliensis* و *Theobroma cacao* التى تم الحصول عليها أثناء طور السكون على التفتح والنمو بالمقارنة مع البراعم التى تم جمعها أثناء طور نمو الأوراق أو الساق. وقد أمتد نفس التأثير عند إعادة تقسيم الساق وزراعته حيث كان عدد البراعم والأشطاء المتكشفة أعلى عند استعمال البراعم التى فى طور السكون كمُستأصل نباتى لتأسيس المزرعة. وربما يرجع ذلك إلى التغير الكبير فى محتوى النبات من السكريات والمركبات الأخرى المصاحبة لبدء النمو عقب السكون.

ثالثاً: العوامل المتعلقة بالمُستأصل النباتى

بفرض ثبات باقى العوامل المتعلقة بالنبات الأم والظروف البيئية فإن هناك الكثير من العوامل المتعلقة بالمُستأصل النباتى نفسه والتى تؤثر على استجابته فى زراعة الأنسجة وهذه العوامل هى:

١. عمر المُستأصل النباتى

يقاس عمر المُستأصل النباتى بعمر العضو النباتى المأخوذ منه هذا الجزء أو عمر النبات الأم، وذلك اعتباراً من تكوين الزيغوت أو تفتح البرعم المكون للنبات. والمقياس الآخر للعمر، هو العمر الفسيولوجى للعضو وهو ما سبق الإشارة إليه عند الحديث عن مرحلة النمو. وأصغر الأجزاء النباتية عمراً هى الأنسجة الغير متكشفة أى

جدول ٤-٥: تأثير عمر النبات الأم وميعاد أخذ المُستأصلات النباتية من أشجار *Quercus euboica* على التكشف في القوارير (Kartsonas & Papafotiou, 2007).

ميعد الزراعة	عمر الأم	% للمستأصلات التي تكشفت	عدد الأشطاء / مُستأصل	متوسط طول الأشطاء
مايو	بادرة	٧٧	١.٣	٢.٧
	أشجار بالغة	٦٩	١.٠	٢.٠
يونيو	بادرة	٦٥	١.١	٣.٧
	أشجار بالغة	٣٤	١.٠	٢.٧
سبتمبر	بادرة	٢٨	١.١	٢.٨
	أشجار بالغة	٢٤	١.٠	٣.٠

الأنسجة الميرستيمية، أما الخلايا المتكشفة الناتجة منها فهي أكبر عمراً. ونظرياً فإن الأنسجة الميرستيمية يمكن أن تظل على هذه الحالة أى فى مرحلة الصبا إلى ما لانهاية لو تم فصل القمم النامية وزراعتها ودفعها إلى تكوين الجذور باستمرار فى المعمل. وفى دراسة لتأثير عمر المُستأصل النباتى على التكشف فصلت منطقة epicotyl وهى تلك الواقعة أعلى الأوراق الفلقية وأسفل الأوراق الحقيقية من بادرات *Vigna mungo* عمرها يتراوح بين ٣ و ١٧ يوم. ويبين (Saini et al., 2002) أن الأشطاء قد تكونت من كلا طرفى المُستأصل النباتى عندما أخذ من بادرات عمرها ثلاثة أيام. وتكشف عدد أكبر الأشطاء فى القاعدة المنغمسة فى بيئة النمو بالمقارنة مع العدد المتكشف من القمة. لكن تكشفت الأشطاء على الطرف العلوى فقط للمُستأصلات الأخرى، ومع هذا لم يكن هناك فرق معنوى فى عدد الأشطاء الكلى بصرف النظر عن عمر المُستأصل كما هو

مبين في جدول رقم (٤-٦). كما تأثر عدد الأشرطة المتكشف بعدد آخر من العوامل الخاصة بالمُستأصل النباتي ستناقش لاحقاً.

وبعد تكوين المزرعة يمكن استخدام النباتات أو الأنسجة الناتجة كمصدر جديد لمزرعة جديدة أو ما يسمى بـ subculture. ويؤثر عمر المزرعة قبل استعمالها كمصدر للمزرعة الجديدة على استجابتها فقد استخدم Quraishi et al. (2004) مُستأصلات من تاج أشجار *Azadirachta indica*، أو من البراعم القاعدية المتفتحة حديثة النمو على قاعدة الأشجار، وكذلك من بادرات حديثة الإنبات. وقد لاحظ فرق في قدرة هذه المُستأصلات على النمو إنتاج الأشرطة. وكان من الضروري استعمال PVP للتغلب على المواد الفينولية في حالة استعمال مُستأصلات من أشجار بالغة وعلى الرغم من ذلك ماتت المُستأصلات التي جمعت من التاج بعد تجديد زراعتها للمرة الثالثة في حين تكونت جذور على المُستأصلات الأخرى. وغالباً للأنسجة المأخوذة من نباتات صغيرة العمر أو أعضاء حديثة التكوين قدرة أعلى على النمو والتكشف في زراعة الأنسجة سواء بالطريقة المباشرة أو غير المباشرة (George, 1993). وقد تظهر كالسات العديد من الأنواع النباتية قدرة أعلى على النمو والتكشف لمدة طويلة تحت ظروف معينة لكنها تفقد هذه القدرة بعد فترة من زراعتها في القوارير. ويرجع ذلك إلى أسباب مازالت قيد البحث وغير معروفة تماماً إلا أن هناك عدة نظريات لتفسير ذلك وهي:

أ. **التباين الوراثي:** عادة يتم انتخاب الخلايا ذات القدرة على النمو في المزرعة لكن قد لا يتفق هذا مع القدرة على التكشف. ولذا قد يؤدي انتخاب الخلايا ذات القدرة العالية على النمو إلى فقدان الخلايا ذات القدرة على التكشف.

جدول ٤-٦: تأثير عمر المُستأصل النباتي على تكشف الأَشطاء في نباتات *Vigna mungo* كما وجدها Saini et al. (2002).

عمر البادرة (يوم)	% المُستأصلات التي كونت أشطاء	% المُستأصلات التي كونت أشطاء في كلا الطرفين	متوسط عدد الأَشطاء/مُستأصل	متوسط طول الأَشطاء
٣	٣٣.٣	١٦.٦	١.٧	٣.٠
٨	٤٤.٤	.	٣.٦	٣.٢
١٢	٥٦.٦	.	٣.٦	٢.٩
١٧	٧٧.٥	.	٣.٦	٢.٠

ب. وجود مواد مشجعة على الكشف: قد تحتوى الأنسجة حديثة الزراعة على مواد مشجعة للنمو والتكشف وباستمرار زراعتها يحدث نقص في التركيز الضرورى لذلك. أو قد تتراكم مواد مثبطه للنمو والتكشف أثناء مراحل الزراعة السابقة. وقد أكد Blanco et al. (1997) هذه الفرضية فى دراسة لإكثار إحدى سلالات قصب السكر عن طريق الأجنة الجسدية حيث لاحظ انخفاض فى المحتوى الكلى للبروتين فى الكالس، وارتبط ذلك بالقدرة على كشف النباتات. فبعد سنة أشهر من الزراعة تم فيها إعادة الزراعة تسع مرات فقد الكالس القدرة على الكشف حيث أنخفض البروتين الكلى من ٥.١-٤.٧ ملجم/جرام طازج من الكالس إلى أقل من ٠.١ ملجم على أساس نوع الأوكسين المستعمل. ويشير التحليل الكهربى للبروتين المستخلص من الكالس إلى وجود بروتين محدد تراوح وزنه على أساس نوع الأوكسين المستعمل بين ٥٥ و ٦٧ كيلو دالتون. وسجل وجود هذا البروتين بعد نقل الكالس إلى بيئة الكشف بيوم واحد وقد ارتبط وجود هذا البروتين بالقدرة على الكشف.

ج. التغيرات الوراثية: رغم احتفاظ الخلية بمعلوماتها الوراثية الضرورية للكشف إلا أنه من الضرورى المحافظة على آلية العمل المنظم لهذه المنظومة والتي قد يحدث

لها فقد باستمرار الإكثار أو تصبح غير فعالة نتيجة حدوث تغيرات وراثية ترجع إلى الظروف البيئة وهو ما يعرف بالتغيرات الوراثية الجسدية سواء الوراثة أو فوق الوراثة (انظر الفصل السابع). وباستخدام الوراثة الجزيئية يبين (Hao & Deng, 2002) أن كالتات البرتقال تفقد قدرتها على تكوين الأجنة الجسدية بعد عدة مرات من تكرار زراعتها نتيجة لبعض العوامل الوراثة وفوق الوراثة ويمكن للكالت استعادة تلك القدرة عند تعرضه لبعض صور الإجهاد البيئة مثل الحرارة المنخفضة أو التجهيف. ولارتباط مجاميع الميثيل بالحامض النووي دور كبير في هذه الظاهرة. لكن درس (Zhang et al. (2006 معدل التضاعف الكروموسومي في العديد من أصناف الحمضيات أثناء زراعتها في القوارير ولم يجد ارتباط بين معدل التضاعف الحادث وقدرة الخلايا على التكشف أو طول مدة الزراعة بل يمكن فقد ٢٦ طرز وراثي من بين ٣٥ طرز تم دراستها القدرة على تكوين الأجنة الجسدية بطول فترة الزراعة.

٢. موقع وحجم المستأصل النباتي

تتباين قدرة الأنسجة المختلفة المأخوذة من نفس العضو النباتي على النمو والتكشف في زراعة الأنسجة وتعرف هذه الظاهرة باسم Topophysis. وهذا المصطلح مشتق من الكلمة اللاتينية *Topos* والتي تعني المكان وكلمة *Physis* والتي تعني طبيعة *Nature*. وتختلف استجابة الأجزاء المأخوذة لمنظمات النمو ومكونات البيئة الأخرى على أساس مكان وجودها في العضو



المأخوذة منه وربما يتعدى هذا التأثير إلى مرحلة ما بعد النقل من المعمل. ليس هناك تفسير دقيق لهذه الظاهرة (George, 1993). قام (Papafotiou & Martini (2009 بزراعة مستأصلات ورقية من خمسة مناطق لأوراق *Zamioculcas zamiifolia* كما

فى الشكل المبين فى عدة أوساط نمو. وفى البداية لم يشاهد اختلاف بين تلك المُستأصلات إلا أنه بعد الأسبوع الثالث بدأت الأجنة الجسدية فى الكشف من المُستأصل الأول والثانى وبمعدل عالى. وكان أعلى معدل لتكوين الأجنة للمُستأصل المفصول من الموقع الأول عند إضافة 2,4-D فقط للبيئة أما المُستأصل المفصول من الموقع الثانى فكانت أفضل استجابة له عند إضافة BA إلى البيئة. أما المُستأصلات التى فصلت من قمة الورقة والتى لم تتضمن جزء من العرق الوسطى فكانت استجابتها منخفضة جداً. وترجع بعض التفسيرات تأثير مكان المُستأصل إلى دور بعض منظمات النمو مثل الأوكسينات والسييتوكينينات وربما حامض الأبسيسك لكن يعتقد أن الدور الكبير يرجع إلى السييتوكينينات، حيث أشار (Papafotiou & Martini 2009) إلى تحسن فى استجابة المُستأصلات البعيدة عن العرق الوسطى بإضافة السييتوكينين للبيئة.

وفى دراسة قام بها (Bredmose et al. 1999) لتوضيح أثر هذه الظاهرة فى إكثار بعض هجن الورد باستعمال البراعم الجانبية، تم أخذ عقل ساقية كل منها يتكون من برعم واحد فى إبط ورقة مكونة من خمس وريقات على الأقل، بحيث تم أخذ تسع عقل من نفس الساق وبترتيب من ١ إلى ٩ متجها من القمة إلى القاعدة. ولاحظ أن أغلب العقل الثلاثة القاعدية لم تتكشف براعمها أو تكشف لكنها لم تنتج أزهار لإجهاض البرعم الزهرى فى مراحل تكونه الأولى. وكان أيضاً لموضع العقل تأثيراً فى بعض الصفات فقد زادت المدة اللازمة من الزراعة حتى بدء نمو البرعم وكذلك الفترة السابقة لتكوين البرعم الزهرى وطول الحامل الزهرى بالاتجاه إلى أسفل، لكن لم يكن هناك فرق فى قطر الأزهار ولا عمرها بعد القطف. وتختلف استجابة الأجزاء المختلفة المنزرعة من الجزء النباتى لمكونات البيئة والظروف البيئية للزراعة، ففى تجربة أخرى لدراسة تأثير عدة توليفات من منظمات النمو على الكشف العرضى لبراعم نبات التيوليب، وذلك بزراعة أجزاء مأخوذة من مواضع مختلفة من الحامل الزهرى، أوضح (Wright 1980) كما هو مبين فى شكل رقم (٤-٣) أن عدد الأشطاء المتكشفة

تتأثر بموضع المُستأصل النباتي ونوع وتركيز منظمات النمو المستعملة بالإضافة إلى التداخل بينهما.

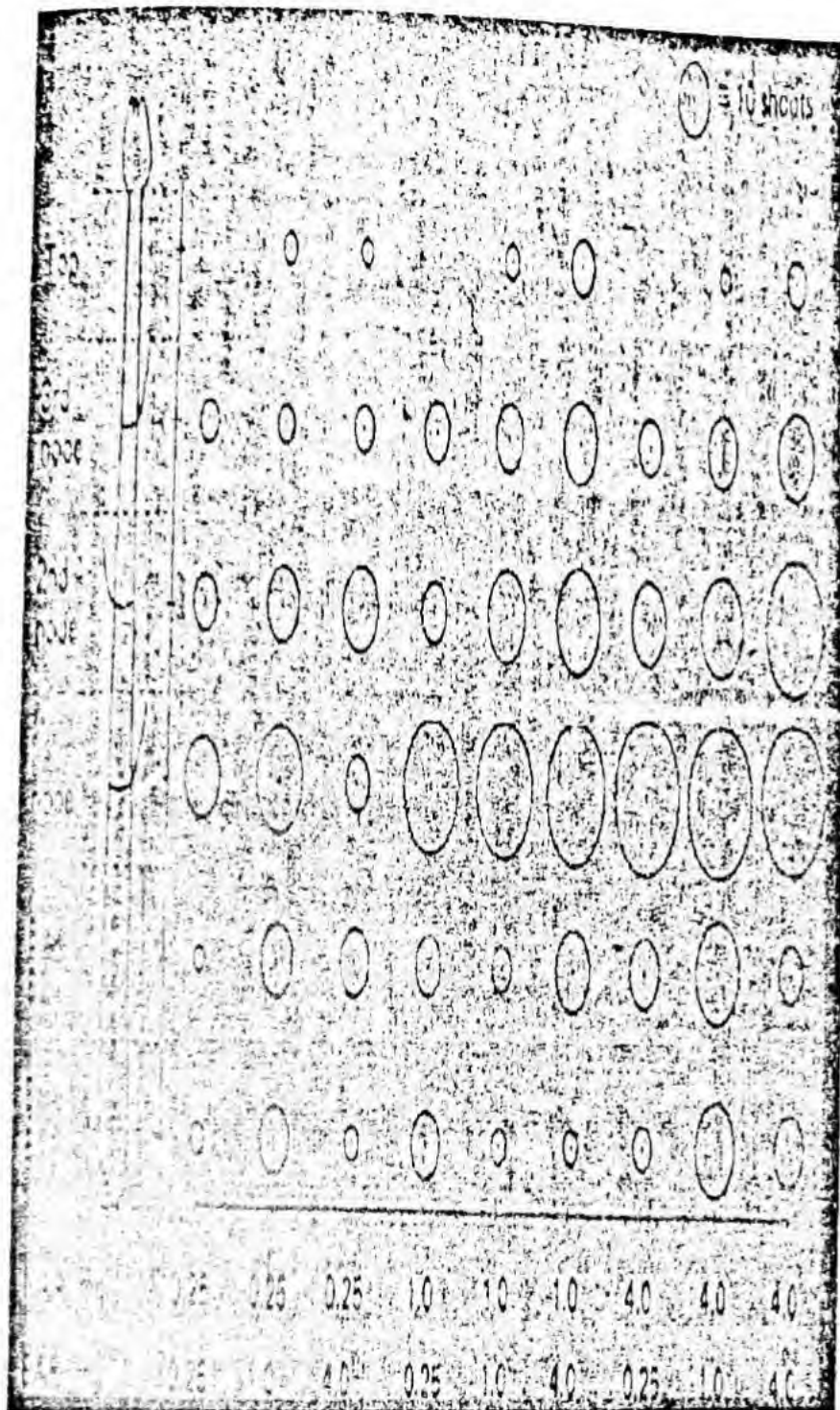
هناك غالباً حجماً مثلاً للمُستأصل النباتي المناسب للزراعة، فالأجزاء الصغيرة جداً سواء أكانت نسيج أو قمة ميرستيمية أو كالس تموت عند زراعتها. أما الأجزاء الكبيرة نسبياً فتكون صعبة التعقيم وكذلك يكون السطح المقطوع أقل نسبياً وبالتالي يقل امتصاص مكونات البيئة، ويؤثر حجم المُستأصل النباتي على نسبة السطح الملامس للبيئة. لكن يجب أن يؤخذ في الاعتبار أن الزيادة النسبية في امتصاص مكونات البيئة لا تعني زيادة معدل النمو والتكشف. فعند تقسيم الجزء الطرفي من ساق نبات *Lilium longiflorum* إلى أجزاء بسماك يتراوح بين ٠.٥ إلى ٣ مم وزراعتها في بيئة تحتوي على نصف تركيز مكونات بيئة MS مع الاحتفاظ بنفس الاتجاه المورفولوجي للأجزاء المنزرعة. أوضحت النتائج أن الأجزاء ذات السمك ٠.٥ مم كانت حيويته منخفضة (٥٠%) أما الأجزاء ذات السمك الأكبر فكانت نسبة بقائها حية أعلى وتتراوح بين ٨٠-١٠٠%، لكن لم تتكون أشطاء في كل الحالات. وبإضافة الفحم المنشط بمعدل ١ جم/لتر تحسنت نسبة بقاء الأنسجة الحية وتكونت أشطاء وكان أعلى معدل لتكوين الأشطاء ٤.١/جزء نباتي عندما استعملت أجزاء ذات سمك ١ مم (كانت مدة الزراعة ٤٥ يوم). وعندما قسمت الساق إلى أجزاء سمكها ١ مم كانت نسبة حيوية الأجزاء العلوية منها (١-٥) مرتفعة وتصل إلى ١٠٠% وانخفضت هذه النسبة إلى ٨٥، ٧٠% على التوالي للجزئين التاليين. كما انخفض معدل تكوين الأشطاء من ٥.٨/ جزء نباتي إلى فرع واحد فقط لكل جزء نباتي بعد ٦٠ يوم من الزراعة (Nhut et al., 2001). وفي معلق الخلايا يلاحظ أن هناك حد أدنى من الكثافة الخلوية الضرورية لنمو الخلايا.

٣. طريقة زراعة المُستأصل النباتي

وهي تعنى اتجاه وضع المُستأصل النباتي في البيئة شبه الصلبة أو البيئة السائلة الثابتة، أما البيئة السائلة المتحركة فلا يمكن المحافظة على اتجاه محدد للمُستأصل. فالأجزاء المأخوذة من الأوراق مثلاً إما أن توضع على سطح البيئة بحيث يكون السطح السفلي أي القاعدة الظاهرية ملامس للبيئة أو توضع بطريقة عكسية. وكذلك بالنسبة للأجزاء المفصولة من السيقان فقد توضع بحيث يكون الجزء القريب من القمة النامية أي القمة الظاهرية متجهاً إلى أعلى أو العكس، أما القمة الظاهرية للجذور فهي الجزء القريب من القمة النامية. ومن المعروف من دراسات علم وظائف النبات أن هناك فرق جهد بين القمة الظاهرية والقاعدة الظاهرية النسيج النباتي. ويرجع ذلك لتأثير وجود أيون الهيدروجين حيث يعمل الأوكسين واليوتاسيوم على حركة أيون الهيدروجين إلى الطرف العلوي من الخلية وبذلك تصبح الخلية ذات شحنة موجبة في الطرف العلوي وشحنة سالبة في الطرف السفلي، أما الخلية الموضوعة أفقياً فهي ذات شحنة موجبة في الناحية العليا وسالبة في الناحية السفلي. ويبين شكل رقم (٤-٤) مدى تأثير زراعة العقل الساقية للقرنفل المحتوية على برعم واحد على التكشف العرضي للأشطاء، كما يلاحظ تكوين الكالس على الطرف السفلي للمُستأصل عند زراعته مقلوباً.

لكن يوضح García-Luis *et al.* (2006) عدم وجود دور للجاذبية الأرضية المتعلقة بطريقة توجيه المُستأصل على مسلك التكشف لمُستأصل بادرات نبات *Troyer citrange* وهو أحد الأصول المستعملة لإكثار الحمضيات. وقد تأثر معدل تكوين الكالس وعدد الأفرع المتكشفة على القطبية و طرف المُستأصل ملامس للبيئة. فبزراعة المُستأصل أفقياً تكون الكالس على كلا الطرفين لكنه كان أكبر عند القاعدة، ورغم أنه لم يسجل فرق في عدد البراعم على كلا الطرفين فإن عدد أكبر من

موقع المستأصل النباتي



تركيز منظمات النمو في بيئة MS

شكل ٣-٤: يوضح تأثير التداخل بين مصدر المستأصل النباتي ومنظمات النمو على عدد الأشطاء الناتجة لكل جزء نباتي مأخوذ من ساق زهرية طولها ٢٢ مم لنباتات لصنف Merry widow من التبوليب (Wright, 1980).



شكل ٤-٤: العقل الساقية للقرنفل منزرعة في وضع مقلوب (يمين) ووضع طبيعي (يسار).

الأشطاء تكون على القمة. لكن عند زراعة المستأصل عمودياً تكون الكالس على الطرف الملاصق للبيئة بصرف النظر عن نوعه، وتكشف الأشطاء مباشرة من القمة إن لم تكن ملامسة للبيئة فإن كانت هي المنغمسة في البيئة تكون الكالس قبل تكشف الأشطاء. وقد أضاف أن تكوين الكالس يرتبط بتركيز السيټوكينين لكن على العكس من ذلك لم يكن تكشف الأشطاء على القمة غير الملامسة للبيئة بسبب السيټوكينينات. وذلك لأنه لم يمكن استحداث تكشف الأشطاء على قاعدة المستأصل البعيدة عن البيئة والمنزوع في وضع مقلوب بالمعاملة الموضعية بنفس التركيز من السيټوكينينات الذي أضيف للبيئة لاستحداث تكوين الأشطاء. وتكشف الأشطاء بطريقة غير مباشرة على القاعدة الملامسة للبيئة وبزراعة المستأصل مقلوب حتى لا تلامس القاعدة البيئة وقف التكشف، ويبين ذلك دور القطبية ولامسة المستأصل للبيئة.

عادة يُظهر المستأصل النباتي نوعاً من القطبية أثناء النمو والتكشف، ويرتبط ذلك بطريقة وضع النسيج في المزرعة واتجاه وضع الأوعية المحتوية على المزرعة. وفي معظم الحالات يتم تكوين الأشطاء من القمة الظاهرية للجزء المنزوع سواء السيقان أو الجذور أما الجذور فتتكشف من القاعدة الظاهرية أي الجزء الأقرب للجذور

من المُستأصلاً لنباتى ويطلق عليها proximal. وقد درس (Newell et al. 2006) كيف تكشف الجذور على عقل نباتات *Lens culinaris* حيث زرع العقل رأسياً فى البيئة فى الوضع الطبيعى أو المقلوب، وقارن ذلك بوضع أنابيب الزراعة المحتوية على الآجار فى وضع مقلوب بعد الزراعة كما فى جدول رقم (٧-٤). ولمعرفة تأثير التهوية قائم بزراعة العقل فى الوضع الطبيعية أو المقلوب فى بيئة استبدل فيها الآجار بخليط من البيت موس والبيرليت والرمل الخشن.

ويتضح من الجدول أن الجذور تكشفت على قاعدة العقل حتى تلك التى زرعت مقلوبة. لكن كان لتأثير التهوية دور مهم حيث كان معدل تكشف الجذور أعلى على القاعدة الموجودة بعيداً عن البيئة أو تلك التى زرعت فى تربة تضمن التهوية بصرف النظر عن اتجاه العقلة.

جدول ٧-٤: تأثير اتجاه الزراعة والتهوية على تجذير عقل *Lens culinaris* كما لاحظها (Newell et al. 2006).

اتجاه العقل ووسط الزراعة						اتجاه العقل وبيئة الزراعة
مخلوط تربة طبيعي		آجار مقلوبة		آجار طبيعي		
↓	↑	↓	↑	↓	↑	وضع الأوعية
٨٤.٤	٩٦.٩	٢٥.٠٠	١٠٠	٦٢.٥	١.٥	معدل تكوين الجذور
٢.٤	٢.٧	١.٣	٢.٠	١.٨	١.٠	متوسط عدد الجذور
١٠.٩	٥.٤	٦.٧	٩.٣	٧.٧	٧.٠	متوسط الطول (سم)

وتتكون الأشطاء غالباً على السطح العلوى أو الجزء البعيد من عنق الورقة عند زراعة الأجزاء الورقية أما الجذور فتتكون على السطح السفلى أو الجزء القريب من الساق. وبتقسيم العضو الواحد إلى عدة أجزاء متساوية فإن بعض الأجزاء بصرف النظر عن موضع النسيج فى ذلك العضو يكون لها قدرة أعلى على النمو والتكشف

دون غيرها على أساس الشحنة الموجودة على النسيج. وتؤثر منظمات النمو المختلفة خاصة IAA على اتجاه القطبية في المستأصل النباتي بسبب حركتها القطبية من أعلى إلى أسفل. وربما تكون القطبية غير واضحة في حالة الأنسجة صغيرة الحجم لكنها تزيد بزيادة حجم النسيج.

وكما أن لاتجاه وضع المستأصل لنباتى تأثير على القطبية فإن وضعه فوق أو داخل البيئة له تأثير على النمو والتكثف. وقد يعزى ذلك إلى القدر المتاح من مكونات البيئة ومنظمات النمو كما أشار (Papafotiou & Martini (2009 فى دراسته على نباتات *Z. zamiifolia* حيث يبين أن وضع المستأصلات عمودياً يقلل من تكوى الأجنة الجسدية بالمقارنة مع الزراعة الأفقية. وقد درس (Orlikowska et al. (2000 تأثير وجود الأوراق والقمة النامية للأفرع أو إزالتها من الجزء المستعمل للزراعة فى نباتات الكروتون *Codiaeum variegatum* مع وضع المستأصل لنباتى فى نفس اتجاه النمو الطبيعى أو أفقياً أو وضعه مقلوباً بحيث تكون القمة النامية إلى أسفل. لكن هذا الاتجاه الأخير لم يُمكن من المحافظة عليه طول فترة التجربة، حيث أدى تكوين الأوراق إلى خلل فى هذا الوضع وجعل المستأصل النباتى يأخذ وضعاً أفقياً بعد فترة من الزراعة. وتوضح النتائج بجدول رقم (٤-٨) تأثير هذه المعاملات على معدل التكشف للأشطاء وطول الأشطاء المتكشفة، ويتضح أن إزالة الأوراق والقمة النامية ووضع النسيج أفقياً أعطت أفضل النتائج.

٤. التنافس بين الميرستيمات المتكونة فى المستأصل النباتى

يؤدى ارتداد بعض خلايا المستأصل النباتى إلى الحالة الميرستيمية عقب الزراعة إلى تثبيط تحول الخلايا الأخرى للحالة الميرستيمية. وتزيد هذه القدرة بزيادة حجم النسيج الميرستيمى، حيث ترسل خلايا هذا النسيج إشارات يعتقد أنها عبارة عن اكسينات إلى الخلايا الأخرى لتثبيط ذاك التحول. وبالتالي يلاحظ أن البراعم العرضية الحديثة تعمل

جدول ٤-٨: تأثير إزالة الأوراق والقمة النامية واتجاه وضع النسيج لنبات *Codiaeum variegatum* على نمو البراعم الجانبية (Orlikowska et al., 2000).

عدد الأشطاء الأطول من اسم	عدد الأشطاء المتكونة	صفة المُستأصل النباتي
٠.٥	١.٥	عدم إزالة الأوراق والوضع رأسياً
١.٣	٢.٤	عدم إزالة الأوراق والوضع رأسياً مع إزالة القمة النامية
١.٩	٣.٩	إزالة الأوراق والوضع رأسياً
١.٠	٣.٥	إزالة الأوراق والوضع رأسياً مع إزالة القمة النامية
٠.٥	٥.١	إزالة الأوراق والوضع أفقياً
٠.٤	٤.٧	إزالة الأوراق والوضع رأسياً مقلوب

على تثبيط تكوين أخرى جديدة، ومن ثم يجب إزالة الأشطاء المتكونة لدفع المُستأصل النباتي إلى تكوين أشطاء جديدة وكذلك الحال للأجنة الجسدية Preece (2008). وقد استدل ببعض الملاحظات على نبات *Picea abies* فبالرغم من تكشف ٣٠-١٠ برعم عند زراعة الأجنة فإن ثلاثة أشطاء فقط استطالت إن لم يتم فصل الأشطاء التي وصل طولها إلى ٣-٥ مم تقريباً وبذلك استطالت باقى البراعم تباعاً، وبالمثل لم تستطيل أشطاء *Pinus radiata* إن لم يتم تقسيم المناطق الميرستيمية وإبعادها عن بعضها البعض. وتختلف شدة هذه الظاهرة باختلاف الأنواع النباتية ومدى التداخل بين العوامل الوراثية ومكونات البيئة وخاصة منظمات النمو.

٥. الجروح

فى الظروف الطبيعية تؤدي عمليات التقليم، والرعى الجائر، والضرر الميكانيكى إلى تشجيع نمو الكالس على الأنسجة المقطوعة أو تشجيع نمو البراعم

الساذكة وكذلك تكوين براعم عرضية في بعض النباتات. وبالطبع أثناء زراعة الأنسجة يتعرض المستأصل النباتي إلى عدة صور من التجريح وكلما كان المستأصل النباتي صغر كت مساحة السطح المقطوع منسوباً للسطح الكلى كبيرة وبالتالي يزيد أثر التجريح. وقد يعزى التغيير الحادث في المستأصل النباتي بعد ذلك إلى المواد المخلفة منه كعسر الإثيلين. هذا وقد سبق مناقشة التأثير الفسيولوجي للتجريح على الأنسجة المزروعة باستفاضة في الفصل الخاص بمنظمات النمو. إلا أنه قد يكون من المفيد الإشارة إلى دراسة Zeng et al. (2009) على أشجار *Citrus reticulate* حيث قام بزراعة مستأصلات مفصولة من البادرات بعد شقها طولياً أو بدون شقها. وقد وصلت نسبة المستأصلات التي تكشف إلى ١٠٠% وبمعدل ١٣.٢ برعم للمستأصل الواحد في مقابل ٦٥% وبمعدل ٦.٧ عند عدم شق المستأصلات. وفي كلا الحالتين تم الكشف بطريقة مباشرة أو غير مباشرة من الكامبيوم الحزمى. ومن ثم يتبين أن إحداث الجروح فى الكامبيوم استحث الخلايا للكشف. ويعتقد أن هذه الطريقة قد تكون بمثابة حل لتكشف الأخطاء فى النباتات التى يصعب زراعتها فى القوارير. ولعل إحداث تجريح للمستأصل النباتي هو من مستلزمات التحول الوراثي عند استخدام *Agrobacterium* كوسيط لنقل الجينات.

رابعاً: العوامل المتعلقة بالظروف البيئية للمزرعة

يقصد بالظروف البيئية فى هذا الصدد الظروف التى يتم فيها تحضير المستأصل النباتي والمزرعة الناتجة منه. فعلى الرغم من وجود المزرعة فى وعاء مقفل يعزل البيئة الداخلية إلى حد ما عن الخارجية، فإن التحكم فى البيئة الخارجية يحور مكونات الداخلية. وفى حالة تكشف نباتات فإن الأجزاء الخضرية منها والموجودة فوق سطح البيئة تكون أكثر تأثراً بالبيئة الخارجية عن الجذور والتى تتأثر بدرجة عالية بالبيئة الداخلية أى الوسط المنزى. ومن ثم فإن التحكم فى البيئة الخارجية

يكون له تأثير مباشر وسريع على الأجزاء الخضرية أما التأثير على المجموع الجذري فيكون بطيء وغير مباشر في معظم الحالات. ويتوقف مدى تأثير الظروف الداخلية بالظروف الخارجية على درجة التبادل الغازي بينهما. وهناك العديد من المراجع المرجعية حول هذا الموضوع منها (2007). Mehrotra et al. و Kotai et al. (1997) ويمكن حصر الظروف البيئية التي تؤثر في زراعة الأنسجة في العوامل التالية:

١. طبيعة البيئة

تستعمل البيئة المغذية في صورة سائلة أو في صورة شبة صلبة كما هو مبين في العديد من مزارع الأنسجة. وأحد أسباب تأثير طبيعة البيئة على زراعة الأنسجة هو وجود ذلك الغشاء الرقيق من الماء الذي يحيط بالمُستأصل النباتي ويلتصق به وهو ما يسمى بـ Nearest layer والذي قد يكون عقبة في طريق انتشار المواد المختلفة من وإلى المُستأصل لنباتي. ويعتمد سمك هذا الغلاف على طبيعة البيئة، ففي البيئة شبة الصلبة يكون سمكاً بالمقارنة مع الحالة السائلة، ويقل هذا السمك أيضاً اعتماداً على درجة رطوبة البيئة. وعلى الرغم من ذلك فإن استعمال البيئة شبة الصلبة سائد في مزارع الأنسجة لأنه يحقق المميزات التالية:

- أ. إمكانية رؤية الأجزاء الصغيرة والتعامل معها.
 - ب. احتفاظ المُستأصل النباتي باتجاه ثابت أثناء الزراعة وبالتالي نمو الأفرع المتكشفة باتجاه طبيعي عكس الوسط السائل المتحرك حيث تقش الأفرع في النمو الطبيعي.
 - ج. عدم الحاجة إلى وسيلة للتنهوية التي قد تكون صعبة التنفيذ أو مرتفعة التكاليف.
- أما عيوب استعمال البيئات الصلبة والتي تعتبر من مميزات استعمال الوسط السائل فهي:

أ. ضرورة تقسيم أو نقل المزرعة كل فترة تتراوح بين ٤ و ٦ أسابيع مما يزيد من تكاليف الإنتاج حيث أن ذلك يتطلب عمالة تقدر بنحو ٤٠-٦٠% من تكاليف الإنتاج.

ب. المواد السامة المفروزة من المستأصل النباتي لا تنتشر بسرعة إلى البيئة وبالتالي تتراكم في النسيج.

ج. التصاق الآجار بجذور النباتات الناتجة يمثل عقبة في عمليات الأقامة والزراعة خارج المعمل لذا يجب التخلص منه وقد يضر ذلك بالجذور المتكونة.

د. صعوبة استعمال الآجار في الأنظمة الميكانيكية فإنه قد يحتوى على مواد مثبطة للنمو أو الكشف أو على الأقل تؤثر على سرعة الكشف.

هـ. صعوبة إزالة البيئة من الأوعية المستخدمة للزراعة والتي يستعمل عددا كبيرا منها فيؤدى ذلك إلى زيادة التكاليف.

ويمكن فى بداية تأسيس المزرعة أى فى المرحلة الأولى استعمال بيئة صلبة صلبة ثم تنقل المزرعة فى المرحلة الثانية من الإكثار إلى بيئة سائلة للعمل على زيادة تكوين البراعم العرضية ثم تنقل بعدها إلى بيئة صلبة فى المرحلة الثالثة لتشجيع تكوين الجذور على الأشطاء. لكن تتوقف إمكانية اتباع هذا الأسلوب على النوع النباتي. وقد استعمل Riek *et al.* (1997) نظام آخر لإكثار الورد يعرف بالبيئة ذات الطورين double phase culture حيث يتم وضع المستأصل النباتي على سطح البيئة الصلبة ويضاف بعد ذلك البيئة السائلة على السطح فتعمل البيئة الصلبة على تثبيت المستأصل النباتي وتقوم البيئة السائلة بتغذيته. وبذلك يمكن إحداث تغيير فى محتويات البيئة بأن تضاف مثلا منظمات نمو لتشجيع التجذير بدلا من نقل الأشطاء إلى أوعية جديدة محتوية على بيئة جديدة. وللحد من التكاليف إنتاج النباتات باستخدام الوسط صلبة الصلب تستعمل البيئات السائلة فقط أو كلا الوسطين فى نفس المزرعة ويكثر استعمال المزارع السائلة فى المعلق الخلوى والأجنة الجسدية ومزارع الجذور على العكس من الإكثار الدقيق وإنتاج النباتات بالرغم من أن التصاق كل المزرعة بالوسط المغذى سوف يشجع امتصاص المزيد من مركبات البيئة وبالتالي تحفيز النمو (Mehrotra *et al.* 2007).

ويعمل استمرار حركة المزرعة على الحد من تأثير السيادة القمية وبالتالي إنتاج المزيد من البراعم التي ربما تنفصل عن بعضها تلقائياً نظراً للحركة الميكانيكية للمزرعة وبالتالي يقل التنافس بين الميرستيمات الذي ذكر آنفاً. وتشجع هذه العوامل على استخدام الميكنة في العديد من مراحل زراعة الأنسجة. وسجل Piatczaka *et al.* (2005) زيادة مقدارها ثلاثة أضعاف في عدد اشطاء *Centaurium erythraea* عند استعمال البيئة السائلة بالمقارنة مع البيئة شبة الصلبة. وصاحب ذلك زيادة في الوزن الكلى الرطب والجاف للأشطاء لكن انخفض وزن الأشطاء الفردية كذلك كانت الأوراق صغيرة ونحيلة. وبالطبع يتوقع أن تكون مشكلة التمييز المائى من المشكلات الأساسية التي تعيق استعمال البيئات السائلة إلا أن ذلك يرتبط بالنوع النباتى ومستوى السيتوكينين. وأمكن تجذير الأشطاء التي تكشفت في وسط سائل عقب نقلها إلى بيئة شبة صلبة بصرف النظر عن التمييز الزجاجى. وبعد الأقامة كان وزن النباتات التي تكشفت سابقاً في بيئة سائلة أعلى من تلك التي تكشفت في وسط شبة صلب، وربما يفسر ذلك بمخزون الأشطاء المرتفع من السكريات والمواد الأخرى.

ونظراً لحاجة الأنسجة المنزرعة المثلى من الأكسجين فإن البيئة السائلة الثابتة لا توفر حاجة النسيج من الأكسجين. وهذا يفرض أن الأنسجة غير منزرعة في طبقة رقيقة من البيئة مثل نظام النقطة المعلقة. وإذا كان من الضروري استعمال البيئة السائلة ولا توجد وسيلة لجعل البيئة متحركة لضمان التهوية فتستعمل طبقة رقيقة منها بحيث يكون جزء من المستأصل النباتى معرضاً للهواء، أو جعل النسيج يطفو فوق السطح باستعمال بعض المواد التي تزيد كثافة البيئة مثل Ficoll. أما الطريقة الشائعة للتهوية في المزارع السائلة فهي استعمال أجهزة رج أو تدعيم النسيج فوق ورق ترشيح. وفي مجال الإكثار التجارى وباستعمال زراعة الأجنة على وجهه الخصوص تستعمل بعض المفاعلات الحيوية Bioreactor صغيرة الحجم والموضح في شكل رقم (٤-٥).

وفي الغالب تقتصر استعمال المفاعلات الحيوية على مرحلة تضاعف الخلايا وتكوين الأجنة الجسدية، ثم تنقل الخلايا أو الأجنة المتكونة إلى بيئة شبة صلبة لتكشف الأشتاء أو النباتات. ويختلف تصميم المفاعل تبعاً للهدف من استعماله مثل المزارع كبيرة الحجم كمعلق الخلايا الذي يستعمل لإنتاج المواد الفعالة معملياً أو بغرض تحويل بعض المواد الأولية إلى مواد ذات أهمية خاصة. لكن عموماً تتم التهوية عن طريق دفع تيار من الهواء المعقم إلى داخل المزرعة (Paek et al., 2005). وهو نفس النظام المتبع في زراعة الخلايا البكتيرية إلا أن هناك بعض العيوب لاستعمال البيئة السائلة بهذا النظام، نظراً للاختلافات الكبيرة بين المزارع البكتيرية والأنسجة النباتية كحساسية بعض الأنسجة لعمليات الرج والضرر الميكانيكي shear stress وتكوين فقاعات ورغوة داخل النظام. وسيتم مناقشة ذلك في الجزء الخاص بزراعة المعلق الخلوي.



شكل ٤-٥: إلى اليسار المفاعل الحيوي Bioreactor المستعمل لزراعة المعلق الخلوي لنباتات *Euphorbia pulcherrima* وإلى اليمين النباتات التي تم أقمتهها (Preil et al., 1991).

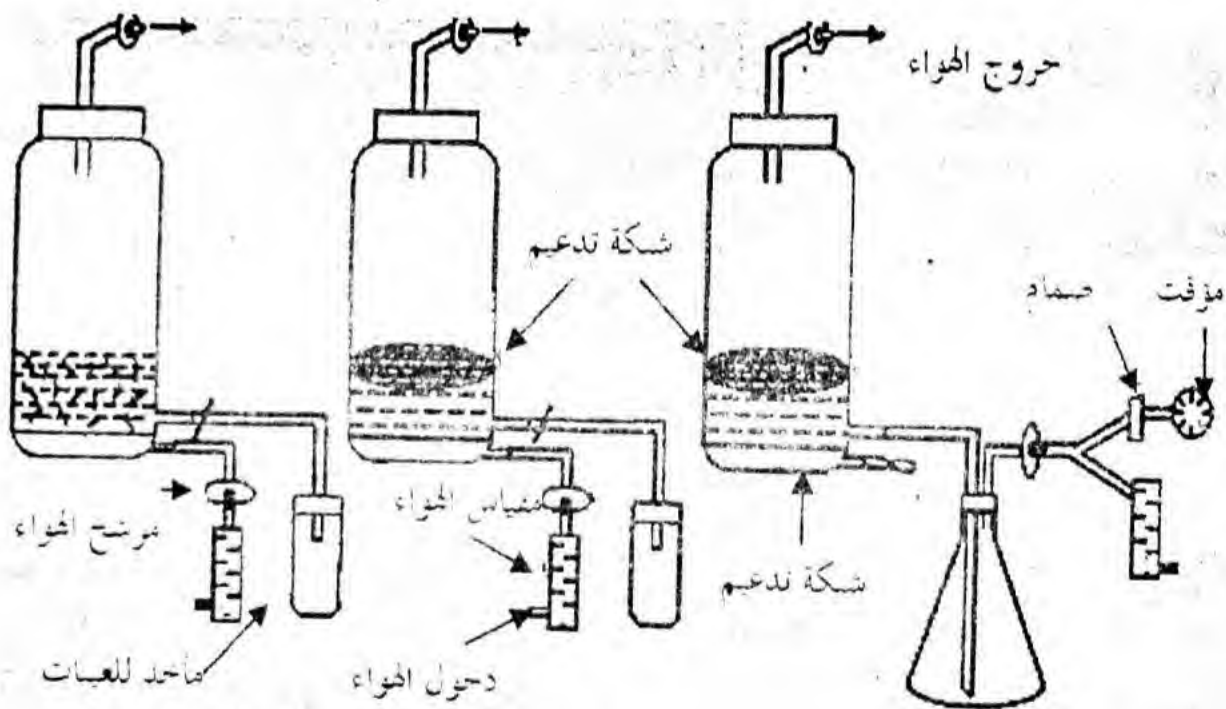
وقد نجح استعمال المفاعلات الحيوية بصورة كبيرة في إنتاج درنات البطاطس وبصيلات *Lillium* والتي تزرع مباشرة في حقول الإنتاج. وأمكن استخدام بعض

التصميمات الحديثة من المفاعلات الحيوية والتي يعتمد التقلب فيها على دفع تيار من الهواء مثل BTBB في إكثار بعض النباتات مثل التفاح والعنب والبيجونيا والأناناس وغيرها باستخدام البراعم العرضية وهو الأمر الذي لم يكن من السهل تحقيقه باستخدام التصميمات القديمة (Paek et al., 2005). ونظراً لصغر حجم الأجنة الجسدية وتمثلها وعدم الحاجة إلى تقطيعها وزراعة كل جزء مستقلاً عن الآخر كما هو الحال في مزارع الأشطاء فإنه يسهل استعمال المفاعلات الحيوية في الإكثار التجاري للكثير من الأنواع. ولعل من المناسب هنا التعرض لمزارع الغمر المؤقت نظراً لاستخداماتها الحديثة في الإكثار التجاري للتغلب على عيوب المفاعلات الحيوية وعدم إمكانية استخدامها في الإكثار التجاري.

أنظمة الغمر المؤقت

نظراً لعيوب استعمال أجهزة bioreactor وصعوبة استخدامها في إنتاج نباتات في مزارع الأنسجة اتجه البعض إلى ابتكار نظم جديدة يعتمد على استعمال الوسط السائل مع محاولة تلافي عيوب المفاعلات الحيوية فيما يعرف بنظام الغمر المؤقت Temporary Immersion System (شكل رقم ٤-٦). وكان كلاً من Harria (1983) & Mason ورواد في هذا الاتجاه حيث تمكنا من عمل أول نظام يعتمد هذه الفكرة وسمى بالـ Tilting System وسمى الجهاز بالـ Auxophyton ويضم تصميم الجهاز غمر الأجزاء المنزرعة في الوسط السائل ثم تعرضها للهواء لتوفير الأكسجين. وعند استعمال هذا الجهاز لأول مرة في زراعة أنسجة الجزر حققت زيادة في الوزن أعلى ٢.٦ مرة من تلك التي سجلت باستعمال وسط شبه صلب. ولا تتوقف أهمية استعمال TIS على زيادة الوزن بل في كثير من الدراسات كانت النباتات الناتجة ذات جودة عالية. فعلى سبيل المثال استخدم Yang & Yeh (2008) نظام TIS في الإكثار الدقيق لنباتات *Calathea orbifolia* بهدف التغلب على انخفاض معدل الأقامة وأشار إلى تأثير نظام المزرعة على التركيب التشريحي لأوراق فزاد سمك الخلايا

الكلورنشيمية والتي تلعب دور هام في الأقلمة في نظام TIS بالمقارنة مع البيئة شبة الصلبة. ولم يتوقف الأمر عند ذلك بل زاد سمك طبقة الشمع على الأوراق وقل عدد الثغور على وحدة المساحة، وربما يرجع ذلك إلى زيادة معدل التهوية في هذا النظام. وكانت قدرة النباتات من نظام TIS على الأقلمة والنمو في البيت المحمي أفضل. لكن على العكس من ذلك اتضحت ظاهرة التميؤ الزجاجي في حوالى نصف الأشطاء الناتجة من TIS والتي لم يتغير عددها الكلى بالمقارنة مع استعمال البيئة التقليدية (Shaik et al., 2009). ثم توالى ابتكار عدد من هذه الأنظمة عقب استخدام Auxophyton. وتصنيف هذه الأنظمة على أساس طريقة عملها إلى :



شكل ٤-٦: رسم تخطيطي يوضح فكرة المفاعل الحيوى المعتمد على الغمر المؤقت في اليمين، ونظام الغمر المستديم ذو شبكة لتدعيم النمو في الوسط وآخر بدون شبكة تدعيم في اليسار (Piao et al., 2003).

Tilting & rocker machines

يعتمد على الحركة المائلة للأوعية ذات الانبعاجات الخارجية التى تشبه القوارير.

Complete immersion of plant material & renewal of the nutrient medium.
يعتمد على غمر كامل للأجزاء النباتية مع تجديد البيئة السائلة.

Partial immersion & a liquid nutrient renewal mechanism;
غمر جزئي للأجزاء النباتية مع تجديد البيئة السائلة.

Complete immersion by pneumatic driven transfer of liquid medium & without nutrient medium renewal

غمر كامل للأجزاء النباتية بنظام الإزاحة الغازية للبيئة السائلة غير المتجددة.

ولمزيد من المعلومات عن تركيب وكيفية عمل هذه الأنظمة وتأثيراتها على إكثار العديد من الأنواع النباتية يرجع إلى المقالات المرجعية (Ziv و Etienne 1999) و (Berthouly & وكذلك Paek et al. (2005). ويلاحظ أن الاختلاف بين هذه الأنظمة يكون في حجم الجهاز، ونوع المزرعة المستعملة فيها، ووجود الحاسوب واستعماله في حساب مدة الغمر أو استعمال مؤقت بسيط، وجود مضخة هواء من عدمه، واستعمال البيئة مرة واحدة أو إعادة استعمالها في دورات متتالية وانفصال خزان البيئة عن أوعية الزراعة أو دمجها معاً. وعلى أي حال فإن هذه الأجهزة كان لها تأثيرات إيجابية على عملية الإكثار الدقيق. ومن الدراسات المرجعية التي تمت الإشارة إليها سابقاً يمكن استخلاص المميزات التالية عند مقارنة هذا النظام مع البيئات شبه الصلبة أو السائلة كما يلي:

أ. **مرحلة تكشف الأشطاء:** عند استعمال هذا النظام لإنتاج أشطاء في *Pinus radiata* أمكن استمرار الإنتاج لمدة ١٨ شهر باستمرار تجديد البيئة ودون الحاجة لتقسيم ونقل المزرعة كما هو الحال عند استعمال البيئة شبه الصلبة. وخلال هذه المدة أمكن فصل الأفرع المناسبة للتجذير ونقلها من الجهاز، وتميزت هذه الأفرع بزيادة عددها وطولها مقارنة مع تلك البيئة في شبه الصلبة.

ب. **تكوين الدرنات:** تحسين معدل النمو وتكوين الدرنات في البطاطس باستعمال أحد أنظمة الغمر المؤقت بالحصول ٥٠٠-٦٩٠ درنة في الجهاز خلال ١٠ أسابيع مقابل ٢٢٠ درنة باستعمال النظام التقليدي Jar fermentor وكان هناك أيضاً زيادة في الوزن الكلى للدرنات وزيادة في درجة التجانس باستعمال الغمر المؤقت. وفي المقابل لم تتكون أى درنات في نظام الغمر المستمر. وكان معدل تكوين الدرنات هو ٣ درنات/عقلة محتوية على برعم واحد. وحقق أكثر من ٥٠% من الدرنات الناتجة وزناً أعلى من ٠.٥ جم/درنة مع تفتحت ٣-٤ عيون من كل درنة في نفس المزرعة مكونة أفرع.

ج. **تكوين الأجنة الجسدية:** استعمل أحد أنواع هذا النظام لتكوين الأجنة الجسدية للجزر ونخيل البلح الذي يعتمد على الغمر لمدة ٥-١٠ دقائق كل ساعتين. وسجل بذلك زيادة ١.٩ مرة في معدل تكوين الأجنة الجسدية للجزر وزيادة ٤ مرات لتكوين الأجنة الجسدية في نخيل البلح مقارنة مع البيئة شبة الصلبة. والأكثر أهمية من زيادة معدل تكوين الأجنة هو التحسن في نوعية الأجنة الناتجة.

د. **تطور الأجنة الجسدية:** تم إنتاج الأجنة الجسدية لـ *Citrus deliciosa* في معلق خلوي وتتبع تطورها في نظام الغمر المؤقت ونظام المعلق الخلوي باستعمال هزاز بسرعة ١٠٠ دورة بالدقيقة أو البيئة شبة الصلبة. في الحالة الأخيرة وجد أن ٦٠% من الأجنة نمت وكونت أوراق فلقية لكن كان بها ظاهرة التميؤ الزجاجي أما عند استعمال نظام الرج لم تتكون الأوراق الفلقية وتوقف تطور الأجنة عند الطور الكروي globular في حين أدى استعمال نظام الغمر المؤقت إلى تكون الأوراق الفلقية في ٦٦% من الأجنة المنزرعة والتي كانت كبيرة الشبه بالأجنة الجسدية المتكونة من نسيج النيوسيلة. كذلك انخفض عدد الأجنة الثانوية وهي ظاهرة غير مرغوبة المتكونة على الجنين الأساسي.

العوامل التى تؤثر فى مدى استجابة المُستَاصِل النباتى لنظام الغمر المؤقت

أ. زمن الغمر: فترة غمر النسيج فى الوسط المغذى هى الفترة التى يتمكّن فيها النسيج من امتصاص المواد المختلفة من البيئة وكذلك غسل المواد المخرجة من النسيج والتى تكون موجودة على سطحه. وتعتبر فترة غمر النسيج من العوامل شديدة التأثير فى ظاهرة التميؤ الزجاجى. ويتباين زمن الغمر الأمثل ومدى تكراره حسب النوع النباتى ونوع النسيج وطور النمو والنظام المستعمل. وقد وجد أن الزمن الطويل للغمر بمعدل (يصل إلى ١-٦ ساعات) فعال فى إنتاج درنات البطاطس، أما الغمر لمدة دقيقة واحدة كل ١٢ ساعة فكان هو الزمن الأمثل فى إنتاج الأجنة الجسدية فى نباتات البن العربى. أما بالنسبة لإنتاج أشطاء العنب فقد كان أفضلها هو تكرار الغمر فى البيئة لمدة ٣٠ ثانية كل ٣٠ دقيقة.

ب. حجم البيئة: إذا لم تكن البيئة متجددة كما فى بعض الأنظمة مثل نظام Twin flasks فلا بد من تحديد الحجم الأمثل للبيئة. وكان الحجم الأمثل عند زراعة أنسجة *Saccharum spp* هو ٥٠٠ مل حيث زاد معدل تكوين الأشطاء من ٨.٣ لكل جزء نباتى إلى ٢٣.٩ خلال ٣٠ يوم من الزراعة. لكن لم يؤثر الحجم فى طول الأشطاء المتكونة. وكان الحجم الأكبر من البيئة أقل كفاءة فى الإكثار، وغل ذلك بأن المزرعة تنتج بعض المواد المشجعة للنمو، وبزيادة حجم البيئة يحدث لهذه المواد تخفيف مما يؤثر سلبياً على النمو.

ج. حجم الأوعية: سبق القول بأن حجم الوعاء من العوامل المؤثرة فى الإكثار الدقيق بوجه عام ويزيد هذا التأثير بالإضافة إلى حجم الفراغ الموجود فى الوعاء فى أنظمة الغمر المؤقت. وفى هذه الأنظمة تستعمل أوعية ذات أحجام تتراوح بين ١-٢٠ لتر. وأمكن الحصول على أشطاء أطول وأقوى نمواً فى العنب فى حالة استعمال أوعية أكبر حجماً.

د. التهوية: يعد نقص الأكسجين في البيئة السائلة من أهم العوامل التي تؤثر سلباً على نمو الأنسجة المنزرعة وخاصة صغيرة الحجم، ويتضح هذا في حالة استعمال الأنظمة التي لا تجدد فيها البيئة. فلم يكن هناك تحسن في نمو أنسجة الموز عند استعمال نظام التقليب وذلك بزراعة أنسجة صغيرة الحجم نسبياً منه. بينما أدى دفع تيار من الهواء في البيئة إلى تحسن في النمو، وكانت أنظمة الغمر الجزئي أفضل الأنظمة التي استخدمت في إكثار الموز. ويلاحظ أن الأنظمة المختلفة تختلف عن بعضها من ناحية توفير الأكسجين والتهوية والرطوبة النسبية. ويعتبر أفضلها في التهوية هو النظام الذي يضم مضخة لدفع الهواء مع دفع البيئة إلى الوعاء المحتوي على المزرعة ثم إعادة سحبه مرة أخرى.

تأثير الزراعة بنظام الغمر المؤقت على النباتات الناتجة

أ. الصفات الظاهرية: كانت مجموعات أشطاء الأناناس التي تكتشت في بيئة سائلة باستعمال Bioreactor ذات شكل كروي غالباً وتبدو وكأنها تنمو حول نقطة مركزية. وأغلب تلك الأشطاء كان صغير الحجم وغير مناسب للتجذير والأقلمة وتطلب الأمر إجراء مرحلة خاصة للاستطالة والتجذير. أما الأشطاء الناتجة في نظام الغمر المؤقت فكانت أطول ونموها أفضل إلا أن أوراقها كانت أصغر حجماً. تحافظ بعض أجهزة نظام الغمر المؤقت على القطبية مثلها مثل استعمال البيئات شبة الصلبة على النقيض من استعمال Bioreactor. وأشار عدد كبير من الباحثين أن هذا النظام كان أفضل من استعمال البيئة شبة الصلبة لإكثار أنواع نباتية متباينة، حيث كانت الأشطاء أطول وأثقل وزناً وربما يرجع ذلك لمعدل التهوية أو لكبر حجم الإناء مما يسمح للأشطاء بالاستطالة. وكذلك في حالة إنتاج الأجنة الجسدية كما سبق ذكره.

ب. ظاهرة التميؤ الزجاجي: رغم أن الزراعة في البيئة السائلة لها العديد من المميزات إلا أن أحد أهم عيوبها هي حدوث ظاهرة التميؤ الزجاجي. وذلك نتيجة استمرار ملامسة النسيج للبيئة وانخفاض معدل التهوية مما يؤدي إلى تغيير في بعض الصفات الظاهرية والفسيولوجية للأنسجة. ويمكن التغلب على هذه الظاهرة في هذا النظام بزيادة التهوية وتقليل زمن التصاق البيئة بالنسيج. وقد سبق الإشارة إلى ضرورة تحديد الزمن الأمثل لمدة الغمر وتكراره، وبالطبع تزداد هذه الظاهرة بزيادة مدة الغمر وقصر الفترة الفاصلة.

ج. الأقلمة: تميزت النبيتات الناتجة من هذا النظام لمعظم الأنواع التي تم دراستها كقصب السكر، الموز، البن وغيرها بقدرة عالية على الأقلمة مقارنة مع النبيتات الناتجة من استعمال البيئة السائلة أو شبة الصلبة فقد وصلت نسبة نجاح الأقلمة إلى ٩٥ : ١٠٠% في قصب السكر وكان طول النبيتات المنقولة لا يقل عن ٦ سم. وامتد هذا التأثير إلى مرحلة النمو بعد الأقلمة في نباتات *Callistephus hortensis* حيث كانت صفات النمو المختلفة أفضل من تلك النباتات الناتجة في بيئة شبة الصلبة.

٢. نوعية الأوعية

تتباين نوعية الأوعية المستعملة في زراعة الأنسجة لكنها لا بد وأن تفي بشرط الشفافية ليسهل رؤية المزرعة وفحصها بالإضافة لمرور الضوء. ومن ثم يمكن استعمال الزجاج أو البلاستيك بأنواعه المختلفة. وعادة يفضل استعمال تلك المصنوعة من الزجاج حيث يمكن استعماله مرات عديدة مع سهولة غسيله وتعقيمه. لكن يلاحظ أن الأنواع الرخيصة الثمن من الزجاج غير مناسبة بشكل مطلق حيث تتحرر منها بعض المواد الضارة للمزرعة ويبدأ حدوث ذلك بعد فترة ١٢-١٨ شهر من التصنيع. وهناك بعض الطرق الكيميائية لإعادة الأوعية بعد هذه الفترة إلى حالتها الأولى أي قبل تحرر هذه المواد (George, 1993). أما البلاستيك فهو سهل الاستعمال لكن الأنواع

ذات القابلية للتعقيم الحرارى غالية الثمن. وعموماً على النطاق التجارى يستعمل الزجاج العادى أما فى أغراض البحث العلمى فيجب استعمال أنواع جيدة من الزجاج Invigorated (IG).

بالطبع يلزم تغطية الأوعية المستعملة لتجنب حدوث تلوث المزرعة لكن يجب عدم إحكام الغلق إذا كانت مادة الغطاء غير منفذة للغازات حتى يسمح بالتبادل الغازى لكن من الضرورى الحفاظ على عدم تلوث البيئة وعدم جفافها بدرجة عالية ويضيف (Jackson, 2003) أن النباتات فى الأوعية محكمة الغلق هى بمثابة النباتات النامية تحت سطح الماء، لكن فى الحالة الأخيرة فإن بعض النباتات قد تأقلمت على التغلب على هذه الظروف. ويتم صناعة الأغشية من مواد مختلفة مثل القطن والبلاستيك والمعادن كالألومنيوم. ويتوقف عدد مرات حدوث إحلال الغازات الداخلية بالغازات الخارجية على نوع مادة الغطاء. ويمكن رفع هذا المعدل ٣-٦ مرات باستعمال الأغشية المنفذة مثل البولى بروبيلين. وقد قورن معدل التبادل الغازى الحادث فى ساعة واحدة لأنابيب زراعة حجمها ٤٥ مل وذات قاع مسطح ومغطاة بغطاء من الألومونيوم أو البلاستيك أو المطاط فكانت ٠.١٨، ١.٥، ٠.٦ سم^٢ على التوالى. لكن يجب الأخذ فى الاعتبار أن المواد البلاستيكية سواء كانت أوعية أو أغشية تتحلل منها بعض المواد المتطايرة التى تذوب فى البيئة وقد تؤثر على مدى استجابة المتأصل النباتى (George, 1993).

ولعل من المفيد أن يشار إلى دراسة (Islam et al. (2005 حيث قام بإكثار عدة طرز وراثية من النعناع باستخدام أنواع مختلفة من الأوعية؛ هى برطمانات مصنوعة من الزجاج التجارى (IG) سعتها ٣٣٠ مل، وأوعية الزراعة المعروفة بـ Magenta vessels (MV) التى يتيح تصميم غطائها التبادل الغازى وسعتها ٣٨٠ مل، والدوارق المخروطية (EF) سعة ١٦٣ مل وأنابيب الزراعة سعة ٥٣ مل. وتم

تغطية البرطمانات بعد وضع قرص من القطن بين الغطاء والفوهة ليضمن التبادل الجيد للغازات، أما أنابيب الزراعة والدوارق فتم تغطيتها بورق الألمونيوم ضغط باليد حول الفوهة. وكان حجم البيئة المستعمل في الأوعية السابقة هو ٥٠، ٤٠، و ٣٠، و ١٠ مل على التوالي وزرع بكل وعاء ٥، ٥، و ٣ في الثلاث أنواع الأولى من الأوعية أما النوع الرابع فزرع به مُستأصل واحد (CT1) أو مُستأصلين (CT2). وقد قام بقياس عدد هام من المتغيرات التي تأثرت بنوعية الأوعية (جدول رقم ٤-٩). ويتبين أن أعلى فقد في وزن البيئة وكذلك البخر نتج ووزن للنباتات كما عند استعمال أوعية من الزجاج التجارى، بينما كان أقل نقص في البيئة ووزن النباتات كان عند استعمال أنابيب زراعة تحتوى على مُستأصلين نباتيين. وبدون زراعة المُستأصلات في الأوعية كان الفقد في البيئة وزيادة الفراغ الداخلى أعلى في حالة الأوعية المصنوعة من الزجاج التجارى. وعموما كان أفضل نمو بزراعة النباتات في الأوعية التي تضمن التهوية.

جدول ٩-٤: تأثير نوع الوعاء على مزارع القمم النامية للنعناع (Islam et al., 2005).

نوع الوعاء					الصفة
CT2	CT1	EF	MV	IG	
١.١٠	٢.١٦	١.١٧	٢.١٩	٤.٨٢	الفقد في وزن المزرعة (جم)
٠.٤٣	٠.٥٩	٠.٦٨	٠.٩١	١.٠١	وزن النباتات (جم)
٠.٦٨	١.٥٧	٠.٥٠	١.٢٩	٣.٨١	البخر نتح
٧.٣٧	٧.٣٧	٨.٣٦	٩.٤٤	٢٠.٠	% للنقص في البيئة
٣.٣٧	٣.٧٩	١١.١١	٥.٤٢	١٠.٤٩	% لزيادة الفراغ الداخلى
٢٢.٣٩	٢٧.٦٨	٢٨.٦١	٢٩.٠٦	٢٧.٣٢	عدد الأوراق/نبات

تقلل سرعة التبادل الغازى فى جو المزرعة من ظاهرة التميؤ الزجاجى وتحسن من النمو فى عديد من النباتات مثلا لبطاطس والطماطم و *Gypsophila paniculata* و *Dianthus caryophyllus* . من الأمثلة التى توضح أثر الغطاء على

زراعة الأنسجة كنتيجة لتأثيرها في التبادل الغازي ومحتوى الرطوبة داخل الإناء ما أوضحه (Tsuru et al. (2000 عند استعماله نظامين لتغطية الأوعية المستعملة لإكثار نباتات *Lavandule vera* الأول نظام مقفول closed culture system وفيه استعمل ورق الألمونيوم. أما النظام الثاني فهو النظام المفتوح open culture system حيث استعملت نفس المادة مع ترك فتحات مربعة الشكل طول ضلعها ٧ مم غطيت بمرشح ذو أقطار ٠.٢٥ ميكروميتر ليسمح بالتبادل الغازي. وأتضح أن الأشطاء التي تكونت في النظام المفتوح كانت أكثر طولاً ولم تتضح فيها ظاهرة التميؤ الزجاجة وأرجع ذلك لخفض تركيز ثاني أكسيد الكربون في الجو الداخلي ومنع تكثف بخار الماء على السطح الداخلي للوعاء. وامتد هذا التأثير إلى مرحلة التجذير، فالأشطاء التي تكونت في النظام المفتوح كونت عدداً أكبر من الجذور مقابل ١-٥ جذر لكل نبات فقط في النظام المقفول. كما كان هناك تداخل واضح بين النظام المتبع ومنظمات النمو المستعملة للتجذير. وكان لاختلاف القدرة على التجذير وظاهرة التميؤ الزجاجة ارتباط بالقدرة على الأقلية حيث أمكن لـ ٩٥% من النباتات الناتجة من النظام المفتوح الأقلية مقابل ٣٣% فقط للنباتات الناتجة من النظام المقفول.

- كما يتباين حجم الأوعية المستعملة في زراعة الأنسجة وهناك العديد من الأمثلة التي توضح تأثير حجم الوعاء على النمو والتكشف عن طريق:
- أ. تأثيره على محتواه من الأكسجين وثاني أكسيد الكربون والإثيلين والمواد الطيارة الأخرى.
 - ب. اختلاف النسب المختلفة بين العناصر وبعضها وحجم المستأصل النباتي والفراغ الغازي وحجم البيئة.
 - ج. تأثيره على معدل انتشار الغازات من وإلى الوعاء.

وعادة يكون الوعاء الأكبر حجماً أفضل إذا كان معدل النمو عالى، أما إذا كان المستأصل النباتي صغير الحجم ومعدل النمو بطئ فيفضل الوعاء الأصغر حجماً.

ويقل الإناء الأصغر حجماً من الكشف وقد يتعدى ذلك الأمر إلى تأثيره على مواصفات الأفرع المتكشفة، ففي مزرعة أشطاء نباتات *Gerbera* كانت الأشطاء الناتجة في مخبر سعة ١٢٥ مل أفضل من تلك الناتجة من أنابيب ١٥٠/٢٥ مم وكان معدل التجذير أفضل عند استعمال أوعية سعة ٢٥٠ مل. بمعنى أن هناك حجم أمثل لكنه يختلف باختلاف النوع النباتي ونوع المزرعة ومرحلة زراعة الأنسجة ونوع مادة الإناء وحجم البيئة وكثافة الزراعة. كما يلعب شكل الإناء دوراً في ذلك حيث يكون معدل انتشار الغازات أعلى في الوعاء القصير بالمقارنة مع الطويل رغم أن كلاهما متساويان في الحجم (Jackson, 2003).

٣. الغازات

خلال عقود طويلة افترض أن المكونات المختلفة للبيئة في القوارير هي العناصر الأساسية التي يمكن عن طريقها التحكم في نمو وتطور الأنسجة. ومما لا شك فيه أن الهواء من ضروريات نمو النباتات فلا يمكن للأنسجة أن تعيش بدون الأكسجين، أما ثاني أكسيد الكربون فهو حجر الأساس في عملية البناء الضوئي. والمكون الآخر الذي يوجد بنسبة عالية في جو المزرعة هو الإيثيلين والذي ينظر إليه الآن على أنه هرمون نمو وليس كمركب سام للخلايا حيث يؤثر في النمو والتطور بمعدل يتراوح بين ٠.٠١ و ١٠ جزء في المليون. لكن لا يقف الأمر عند ذلك حيث أصبح من الثابت أهمية دراسة الغازات المختلفة في جو مزرعة الإكثار الدقيق، وقد تناول ذلك بالتفصيل George (1993) و Jackson, 2003) و Zobayed (2005) في مقالات مرجعية يمكن الجوع إليها للإطلاع على الكثير من المعلومات التي يناقشها هذا الجزء.

إن حاجة المزرعة للتهوية أو للتبادل الغازي بين جو المزرعة والفراغ الخارجى يعتمد على نوع المزرعة وحجمها. وتلعب النسبة بين حجم الأنسجة إلى حجم

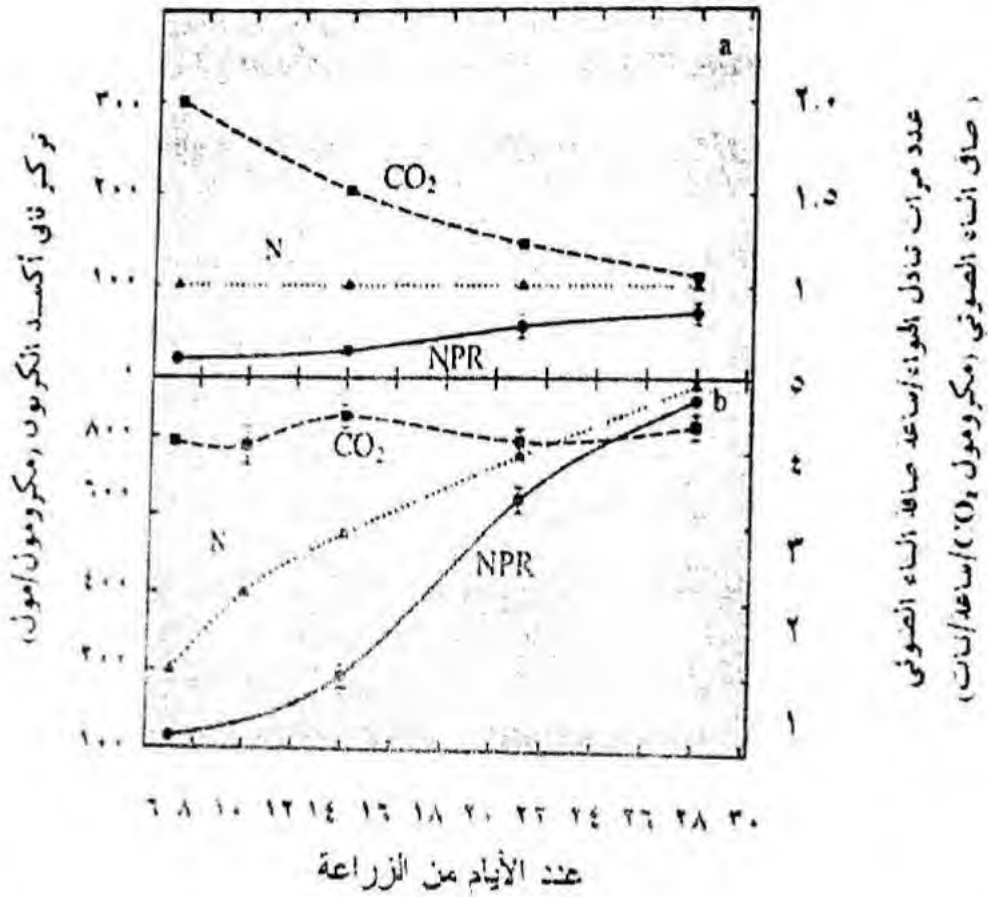
الرعاة دور هام جداً في تأثير التبادل الغازي على نمو الأنسجة فالحجم الكبير للأنسجة يعني أن صغر الفراغ المتاح للانتشار الغازي. ويتعدى الأمر ذلك حيث كبر حجم النسيج يعني الانخفاض النسبي في التبادل الغازي للأنسجة الداخلية الغير ملامسة للهواء. لكن يعتبر الحد من تبادل الغازات عبر نوعية الأوعية والأغطية على رأس تلك العوامل السابقة والذي لا يحرم المزرعة من المكونات الطبيعية للهواء بل يرفع من الرطوبة النسبية وتركيز بعض الغازات الناتجة من عمليات الأيض كالأثيلين وأكسيد النتريت وغيرها. ومن ثم يلاحظ تثبيط عالي في عملية البناء الضوئي، والنتج، وامتصاص الماء والذائبات من البيئة وكذلك ثاني أكسيد الكربون مع زيادة في معدل التنفس في فترة الظلام وينعكس ذلك في النهاية على ضعف النمو والعديد من الصور غير الطبيعية في الشكل المظهري والتشريحي والوظيفي للنباتات في القوارير. وهناك بعض المواد الطيارة الأخرى التي تخلق في المزرعة مثل الإيثان، والميثان، والاسيتيلين، والاسيتالدهيد وقد تسبب بعض المشكلات مثل الموت الموضعي للأنسجة وتثبيط نمو النباتات إن لم يتم التخلص منها بالتهوية الجيدة لجو المزرعة.

وعلى الرغم أن كمية قليلة من الغازات يمكن أن تدخل وتخرج من أوعية الزراعة بسبب التباين الحادث في درجات الحرارة في غرفة النمو إلا أنه يحدث تغيير ملحوظ في المكونات الغازية في جو الإناء المستعمل نتيجة للانتشار الغازي. ويتراوح معدل تدفق الغازات في أوعية الزراعة بين ٠-٢٥ ملم/ساعة، ويتوقف ذلك على عدة عوامل منها شكل وحجم الإناء ومادة الغطاء ودرجات الحرارة وحركة الهواء الخارجى. ولعل عدم إحكام غلق الغطاء أو وضعه فقط فوق الفوهة دون غلقه يحسن بكثير معدل الانتشار الغازي، لكن قد يكون ذلك عامل كبير في تلوث المزرعة خاصة لو كان السكر هو مصدر الكربون في المزرعة. ويزيد معدل الانتشار الغازي بصورة ملحوظة باستعمال أشعة ضوئية ذات طول موجى قصير. كذلك فإن إضافة الفحم المنشط إلى البيئة يزيد من معدل التدفق الغازي حيث يعمل الفحم على امتصاص

الأشعة الضوئية مما يرفع من درجة حرارة البيئة فتتمدد الغازات الداخلية فيتم التبادل الغازي. وفي فترة الظلام ينكمش الهواء الداخلي ببرودة البيئة فتقل بمعدل ١-٣ درجات بالمقارنة بفترة الإضاءة رغم ثبات درجة حرارة الغرفة في كلا الحالتين، فيدخل الهواء الخارجي وهكذا.

وتتوقف نسبة وجود الأكسجين في جو المزرعة على معدل انتشاره وغالباً يكون تركيز الأكسجين في سطح المستأصل النباتي مساوياً لنسبته في جو المزرعة لو كانت الأنسجة غير متحركة ومحاطة بغشاء رقيق جداً من البيئة أما الأنسجة المغمورة في البيئة الثابتة فيكون تركيز الأكسجين بها منخفضاً. ويزيد تركيز الأثيلين حول النسيج بزيادة سمك الغلاف المائي المحيط بالنسيج. ويمكن تغيير محتوى المزرعة من الأكسجين عن طريق تغيير تركيز الأكسجين في غرفة الزراعة أو بنفع تيار من الأكسجين إلى داخل الأوعية. ومن الطبيعي أن ينخفض محتوى الأكسجين في الأوعية محكمة الغلق حيث يستهلك جزء منه في التنفس ولا يتم تعويضه بعملية البناء الضوئي. وبما أن النمو والتكشف يتأثران بالتنفس عن طريق عدد من التفاعلات الكيميائية فإن التغيير الحادث في محتوى الأكسجين ينعكس أيضاً على النمو والتكشف. ويتبين أن الانتشار الغازي لا يكون كافياً في معظم الحالات لتحقيق النمو الأمثل، ومن ثم يتم زيادة معدل التبادل الغازي أما بتشجيع التبادل الغازي بالانتشار الطبيعي عبر استخدام أغشية خاصة كتلك المصنوعة من polypropylene وهي عديدة ومن حيث نوعيتها وسمكها وقطر الثقوب الدقيقة بها وبالتالي تختلف فيما بينها في معدل تغير المحتوى الغازي الداخلي. لو قد استعمل البعض عدة طبقات من القطن، لكن قد يكون معدل الانتشار الغازي بهذه الوسيلة غير كافى خاصة في الأوعية كبيرة الحجم نسبياً. ولزيادة هذا المعدل يمكن دفع تيار من الهواء أو ثاني أكسيد الكربون إلى جو المزرعة. ويتضح أن معدل تبادل الغاز في حالة الاعتماد على التهوية الطبيعية متفاوت ويخضع للعديد من العوامل ولا يمكن التحكم فيه بدقة وعلى العكس من ذلك يمكن التحكم بدقة

فى معدل التبادل الغازى والرطوبة عن طريق دفع تيار من الهواء لفراغ المزرعة، ومن ثم يمكن الحصول على معدل نمو عالى (شكل رقم ٧-٤).



شكل ٧-٤: تركيز CO₂ وصافي عملية البناء الضوئي (NPR)، وعدد مرات تبادل الغازات (N) والكتلة الحيوية فى مزارع نباتات الكافور ذات الهوية الطبيعية أعلى وعن طريق دفع تيار من الهواء من أسفل (Zobayed, 2005).

ويشير الشكل إلى اختلاف تركيز الغازات داخل الوعاء المستخدم لزراعة نباتات *Eucalyptus* فى كلا النظامين وقد ارتبط ذلك بزيادة معدل البناء الضوئي والكتلة الحيوية للنباتات. ويلاحظ أيضاً استهلاك ثاني أكسيد الكربون أثناء فترة الإضاءة عند استعمال التهوية بدفع تيار من الهواء مقارنة مع التهوية الطبيعية. لكن بزيادة معدل ثاني أكسيد الكربون الذى يتم دفعه للوعاء يمكن الحصول على ثابت فى تركيزه، وكذلك زيادة معدل النمو (Zobayed et al., 2001). وقد وضع Ivanova &

Van Staden (2010) أن لزيادة معدل التهوية دوراً بارزاً في التغلب على ظاهرة التميؤ الزجاجي في بعض نباتات *Aloe polyphylla* وكذلك زاد معدل الكشف وانخفضت نسبة نباتات *Dianthus caryophyllus* المتمنية زجاجياً خاصاً عند ارتفاع مستوى الفوسفات بالبيئة (Mohamed, 2011). ويعتبر ذلك من أساسيات دفع النباتات بالمزرعة لتعتمد على نفسها في تخليق السكر بعملية البناء الضوئي. وقد ناقش Zobayed (2005) العديد من الأنظمة التي صممت لرفع تركيز ثاني أكسيد الكربون في جو المزرعة.

تقوم الأنسجة المنزرعة بالتنفس وبالتالي تنتج غاز ثاني أكسيد الكربون الذي قد يستهلك جزء منه في البناء الضوئي إن كان هناك فرصة لحدوثه، حيث أن السكر وهو الهدف من عملية البناء الضوئي يتم إضافته للبيئة فتكون معظم الخلايا غير ذاتية التغذية. لكن بعض الأنسجة الخضراء وبعض الخلايا قد تكون ذاتية التغذية وتقوم بعملية البناء الضوئي وبالتالي يلعب تركيز ثاني أكسيد الكربون ودرجة الحرارة بالإضافة إلى الضوء دوراً في نشاطها. ويبلغ تركيز ثاني أكسيد الكربون في جو الغرفة ٠.٣٥% لكن يلاحظ ارتفاعه في جو غرف الزراعة إلى ٠.٤٠-٠.٨٠% وليس من الضروري أن تكون نسبة وجوده في غرف الزراعة هي نفس نسبة وجوده في داخل جو المزرعة حيث يتوقف ذلك على معدل الانتشار الغازي. وبالطبع إن كانت الأنسجة المنزرعة غير خضراء أي لا تقوم باستهلاك جزء من ثاني أكسيد الكربون فإن تركيزه يزيد وقد يصل إلى ١٥٠ مرة أعلى من تركيزه خارج جو المزرعة. وتزيد هذه النسبة إلى ١٠٠٠ مرة في حالة الظلام وإحكام غلق المزرعة حيث يستمر التنفس وتوقف عملية البناء.

إذا كانت الكثافة الضوئية منخفضة أو تركيز ثاني أكسيد الكربون غير كافٍ للبناء الضوئي فإن الأنسجة أو النبيتات تصل إلى أقل من نقطة التعويض

compensation point حيث يكون الصافي من عملية البناء غير كافى للتنفس ويؤدى ذلك إلى موت الأنسجة أو النبيتات. ورغم أن النبيتات الناتجة من زراعة الأنسجة تحتوى على نظام نقل إلكترونى فعال جدا لعملية البناء الضوئى إلا أن الإنزيمات الضرورية لهذه العملية لا تكون كافية بالمقارنة مع النباتات العادية. وتختلف قدرة النبيتات فى مزارع الأنسجة فى القيام بعملية البناء الضوئى فى حالة أضافه السكر للبيئة فنباتات *Dieffenbachia* على سبيل المثال لها قدرة على تكوين السكر حتى فى حالة إضافته للبيئة. ولوحظ أن معلق بعض الخلايا النباتية خصوصاً فى حالة الكثافة المنخفضة يحتاج إلى ثانى أكسيد الكربون. ويعود ذلك إلى أهميته فى تخليق بعض الأحماض العضوية والأمينية الهامة للنمو والتي لا يمكن تعويضها بمصدر خارجى. كذلك لوحظ تأثير ثانى أكسيد الكربون على الكشف المباشر من خلال تأثيره على تخليق الإثيلين، حيث أن ارتفاع تركيز ثانى أكسيد الكربون يزيد من تخليق الإثيلين ونفس التأثير المثبط للتركيز العالى من ثانى أكسيد الكربون أمكن إحداثه بإضافة المواد المثبطة لإنتاج الإثيلين.

٤. الرطوبة النسبية

الرطوبة النسبية هى مقياس لكمية بخار الماء الموجودة فى الغلاف الغازى منسوبة إلى الكمية الكلية من بخار الماء التى يمكن أن يتشبع بها هذا الغلاف الغازى. وفى بداية الأمر لم تلقى الرطوبة النسبية أهمية لدى المشتغلين بزراعة الأنسجة النباتية حتى تبين أثرها على ظاهرة التميؤ الزجاجى والنمو غير الطبيعى للأوراق. ويلاحظ عند استعمال الأوعية التقليدية وصول الرطوبة النسبية إلى معدل مرتفع جداً يصل إلى ١٠٠% فيلاحظ تكثيف قطرات الماء على السطح الداخلى للأوعية. ويترتب على ذلك الكثير من الآثار السلبية على النمو وربما الكشف (Mohamed & Alsadon, 2010b, 2011).

ولا يمكن أن تناقش الرطوبة النسبية بمعزل عن تأثير الأوعية والغازات كما سبق ذكر ذلك آنفاً، وفي معظم المقالات والدراسات المعملية يتم الربط بين الثلاثة عوامل ونمو المزرعة (George, 1993) و (Zobayed, 2005). فاستخدام الأوعية والأغطية التي تسمح بالتهوية حتماً ستقلل من الرطوبة النسبية الداخلية وقد تحسن من النمو وتزيد من نجاح نقل النباتات إلى البيت المحمي بشكل واضح، وربما يرجع ذلك ولو بصورة جزئية لزيادة معدل النتح ومن ثم امتصاص مكونات البيئة. فعند الإكثار الدقيق لنباتات القرنفل في أوعية توفر تبادل غازي بمعدل ٠.١١، و ٠.٢١، و ٠.٦٨ ، و ٠.٨٦/ساعة من حجم الهواء الداخلى لوحظ أن هناك تغيير في الصفات التشريحية لأوراق الأشطاء المتكشفة. وكان التركيب التشريحي للنباتات النامية في أوعية توفر معدل عالى من تغيير الهواء الداخلى مقارنة للصفات التشريحية للنباتات النامية في البيوت المحمية، حيث كانت الأوراق ذات طبقة كيوتيكل وجدر خلوية سمكة، لكن انخفض حجم الخلايا والمسافات البينية وزاد تركيز صبغات التمثيل الضوئى ووجود الأنسجة الدعامية. وتلك الصفات التشريحية ملازمة لزيادة معدل فقد الماء من النباتات والذي يزيد بزيادة معدل التهوية وأدت تلك الصفات التشريحية إلى ارتفاع نسبة النباتات التي أمكن أقلمتها. وتعمل التهوية على زيادة الجهد المائى للبيئة حيث تنخفض الرطوبة النسبية وقد يكون ذلك أحد أسباب اختفاء ظاهرة التميز الزجاجى بزيادة التهوية. وقد أوضح (Fal et al. (1999 أن زيادة معدل التهوية يزيد من معدل تكوين الأشطاء الطبيعية في صنفين من القرنفل.

وتتوقف الرطوبة النسبية داخل أوعية الزراعة على درجة حرارة البيئة وطبيعتها ومعدل التبادل الغازى والرطوبة النسبية لغرفة الزراعة. فإذا كانت درجة الحرارة داخل الفراغ الغازى للوعاء هى نفس حرارة غرفة الزراعة والوعاء محكم الغلق فإن الرطوبة النسبية تكون نظرياً ٩٨-٩٩.٥% أى أن الهواء الداخلى مشبع تماماً. لكن تنخفض الرطوبة النسبية بحدوث التبادل البخارى بين الفراغ الداخلى

والخارجي. وأفضل رطوبة نسبية لغرف الزراعة هي ٧٠% وانخفاضها عن ذلك يؤدي إلى جفاف البيئة. ورغم أن ارتفاع الرطوبة النسبية هو أحد العوامل الرئيسية لحدوث ظاهرة التميؤ الزجاجي إلا أن انخفاض الرطوبة النسبية داخل الأوعية إلى ٧٠-٨٠% غير ملائم لنمو معظم أنواع مزارع الأنسجة، فالأجنة الجسدية للجزر تموت إذا انخفضت الرطوبة إلى ٦٠% وكذلك قل عدد الأفرع المتكشفة من نبات *Pelargonium* عند انخفاض الرطوبة عن ٧٥%. وعند تنمية أفرع البطاطس لمدة ١٢ يوم تحت مستويات مختلفة من الرطوبة النسبية شجعت الرطوبة النسبية العالية نمو الأفرع لكن انخفاض حجم الورقة ولم يتأثر الوزن الجاف للنبات. وتؤدي التهوية بدفع تيار من الهواء داخل القوارير خفض الرطوبة النسبية بشكل كبير ينعكس بتأثير سلبي على النمو. ويمكن التغلب على ذلك بزيادة حجم البيئة في القوارير، أو برفع الرطوبة النسبية في غرفة النمو، أو بترطيب الهواء المستعمل في عملية حقن المزرعة.

كما تتوقف الرطوبة النسبية داخل الفراغ الداخلي للوعاء على نسبة مساحة المسطح الورقي الموجود، فزيادة المسطح الورقي تزيد من معدل البخر وبذلك ترتفع الرطوبة النسبية. ومن ثم ينصح بزيادة عدد الأفرع المنزرعة عند استعمال أوعية كبيرة الحجم. ويمكن أن ترفع الرطوبة النسبية داخل الوعاء بوضع كأس به ماء داخل وعاء الزراعة وقد اتبع ذلك في مزرعة لأفرع نبات *Chrysanthemum morifolium*. لكن قبل مرحلة نقل النباتات من المعمل إلى ظروف الأقلعة خارج المعمل يفضل خفض الرطوبة النسبية للمساعدة في أقلمة النباتات وإن كان ذلك يعمل على خفض معدل النمو والتجذير.

٥. الحرارة

تتعرض النباتات في البيئة الطبيعية إلى تباين في درجات الحرارة على مدار الأربع والعشرين ساعة. ومن الأفضل أن تعرض مزارع الأنسجة إلى معدل متباين من

درجات الحرارة خلال الليل والنهار أى فى وقت الظلام والإضاءة إن أمكن ذلك. وقد لوحظ معدل أفضل للنمو والتكشف لعدد من النباتات عندما انخفضت درجة حرارة الليل إلى ٤-٨°م عن درجة حرارة النهار. لكن من الناحية التطبيقية تستعمل معظم المعامل درجة حرارة ثابتة ٢٢-٢٤°م طوال الأربع والعشرين ساعة للنباتات ثلاثية الكربون. أما النباتات رباعية الكربون والنباتات ذات الأيض الحامضى crassulacean acid metabolism (CAM) فربما تحتاج إلى رفع درجات الحرارة إلى ٣٥°م للحصول على أفضل نمو وتكشف (Amoo et al., 2009). وتتباين درجة الحرارة المثلى باختلاف النوع النباتى ونوع المزرعة ومرحلة النمو والغرض منها وغالباً تكون هذه الدرجة أعلى قليلاً من تلك الموجودة فى الحقل، فالنباتات الاستوائية تحتاج درجة حرارة ٢٤-٣٢°م بالمقارنة مع النباتات الواقعة فى المنطقة المعتدلة حيث تحتاج درجة حرارة ٢٠-٢٢°م. هذا مع الأخذ فى الاعتبار أن درجة الحرارة داخل الوعاء تكون أعلى عدة درجات عن تلك خارج الوعاء كما أن حرارة البيئة أعلى من درجة حرارة الفراغ الداخلى (George, 1993).

وقد كان نمو وتكوين أوراق جديدة لأشطاء النعناع عقب زراعة العقد الساقية أو القمم النامية أفضل عند درجة حرارة ٢٥°م بالمقارنة مع ٢٠°م، مع الأخذ فى الاعتبار الفروق بين الطرز الوراثية المختلفى التى استخدمها (Islam et al., 2005) فى دراسته. لكن وجد (Amoo et al., 2009) تداخل بين تأثير الحرارة وعدد ساعات الإضاءة حيث قام بتقييم قدرة مُستأصلات *Huernia hystrix* على التكشف ونمو الأشطاء تحت درجات حرارة متباينة مع استخدام إضاءة مستمرة لمدة ٢٤ ساعة أو تحت ١٦ ساعة ضوء يعقبها ٦ ساعات إظلام. وقد كان معدل التكشف ٢٨% عند درجة حرارة ١٥°م وارتفع إلى ٨٣% عند درجة ٢٠°م. وبالرغم عدم تأثير لدرجات الحرارة على النسبة المئوية للتكشف وعدد الأشطاء عند الإضاءة المستمرة، فإن رفع

درجة الحرارة من 25°C إلى 30°C قل من استطالة ووزن الأَشْطاء وكان 38% من الأَشْطاء شاحبة اللون. أما عند نظام إضاءة $8/16$ فإن أفضل معدل لعدد الأَشْطاء وكذلك طولها ووزنها كان عند درجة حرارة 35°C (جدول رقم ٤-١٠). وقد فسر ذلك بأن درجات الحرارة العالية تحت الإضاءة المستمرة تقلل من معدل تخليق ATP و NADPH في النباتات ثلاثية الكربون، وبالتالي يقل معدل تثبيت ثاني أكسيد الكربون الضروري للنمو. ويذكر الباحث أن انخفاض معدل النمو والتكشف عند درجة الحرارة المنخفضة قد يكون ذا أهمية في حفظ الأنسجة في القوارير، لأن قدرة هذه الأنسجة على النمو والتكشف عند نقلها إلى درجة حرارة 25°C كانت أفضل من تلك التي زرعت مباشرة على نفس درجة الحرارة. وكذلك هناك ملاحظات أخرى على التداخل بين درجات الحرارة والطاقة الضوئية على استطالة نبيتات البطاطس في مزارع الأنسجة (Kozai et al., 1995).

ولدراسة تأثير التغيير في درجات الحرارة أثناء فترات الإضاءة والإضاءة على نمو نبيتات البطاطس تحت جو مشبع بغاز ثاني أكسيد الكربون يصل تركيزه إلى $1300-1500$ ميكرومول، باستعمال درجة حرارة ثابتة طوال اليوم 20°C أو $25/15^{\circ}\text{C}$ أثناء فترات الإضاءة والإظلام على التوالي أو العكس أي أن المتوسط اليومي للحرارة هو 20°C في كل الحالات. ووجد أن طول الأفرع يزداد عند استعمال درجة حرارة أعلى 25°C أثناء فترة الإضاءة و 15°C أثناء الإظلام، لكن لم يكن هناك تأثير على الوزن الرطب والجاف. وفي نفس التجربة وجد أن هناك تداخل معنوي بين الفرق في درجات حرارة الليل والنهار وشدة الإضاءة.

في بعض الحالات تجب المعاملة بالبرودة لتشجيع التكشف أو النمو وكسر دور السكون الموجود في بعض النباتات كالأشجار الخشبية والأبصال. فأبصال *Hippeastrum* و *Lilium* و *Hemerocallis* في مرحلة النمو الثالثة من زراعة

جدول ٤- ١٠: تأثير درجات الحرارة وطول الفترة الضوئية على التكشف ونمو أشطاء

نباتات *Huernia hystrix* كما سجلها (Amoo et al. (2009.

درجة الحرارة (°م)	% للمستأصلات التي تكشفت		عدد الأشطاء /مستأصل (منجرام)		وزن الأشطاء /مستأصل (منجرام)	
	عدد ساعات الإضاءة	لم تقاس	عدد ساعات الإضاءة	لم تقاس	عدد ساعات الإضاءة	لم تقاس
١٥	٢٨	لم تقاس	١٦	٢٤	١٦	٢٤
٢٠	٨٣	لم تقاس	١٨	لم تقاس	١١٤	لم تقاس
٢٥	٨٩	١٠٠	٢٣	٤٢	١٩٢	٦٩٠
٣٠	٩٤	٩٦	٢٧	٤١	٢٤٩	٥٦٩
٣٥	٩٤	١٠٠	٤٢	٤٢	١٩٢	٢٥١

الأنسجة يجب تعريضها لمدة ٥٠-١٤٠ يوم لدرجة حرارة ٥٥ م حسب مكونات البيئة. لكن وجد أن تقسيم أبصال *Freesia* إلى قسمين يمكن أن يحل محل البرودة، أما في الأشجار الخشبية فإن المعاملة ببعض منظمات النمو مثل الجبرلين يمكن أن تحل محل البرودة. وفي بعض الحالات فإن المعاملة بالبرودة تكون ضرورية لدفع النباتات إلى التزهير بالذات النباتات ذات الحولين، فأفرع نباتات *Senecio* الناتجة من مزارع الأفرع تحتاج للمعاملة بدرجة حرارة ١٠ م في المعمل لدفعها للإزهار بعد نقلها إلى خارج المعمل. كذلك تستعمل درجات الحرارة المنخفضة لتقليل معدل نمو النباتات في زراعة الأنسجة ويفضل أن يصاحب ذلك خفض الكثافة الضوئية. ويمكن حفظ نباتات البروكلي لمدة ٦ أسابيع بخفض درجة الحرارة إلى ٢ م وباستعمال كثافة ضوئية ٢ ميكرومول/م^٢/ثانية (George, 1993).

٦. الضوء

يعتبر الضوء عامل أساسى فى تكوين الصبغات الملونة للنبات فالبلاستيدات الناضجة توجد فى ثلاثة صور، إما خضراء لإحتوائها على الكلوروفيل، أو ملونة لإحتوائها على الصبغات الأخرى المسببة للون الأزهار والثمار، أو تكون البلاستيدات عديمة اللون كتلك المخزنة للمواد الغذائية مثل النشا أو الليبيدات. وعند حجب الضوء عن البلاستيدات الخضراء فإنها تفقد لونها وتتحول إلى عديمة اللون، والبلاستيدات عديمة اللون قد أن تتحول إلى خضراء عند تعرضها للضوء. والبادرات الزامية فى الظلام تحتوى على بلاستيدات بها بعض التراكيب الداخلية المميزة للبلاستيدات الخضراء لكنها لا تحتوى على كلوروفيل. أما الكالس والخلايا المنزرعة معملياً فى الظلام على العكس من ذلك بها بلاستيدات لكنها لا تحتوى على التراكيب المميزة للبلاستيدات الخضراء أو الكلوروفيل. وعند نقل الكالس أو معلق الخلايا إلى الضوء فإن بعضه قد يكون الكلوروفيل ويبدأ فى عملية البناء الضوئى لكنه نادراً ما يصبح ذاتى التغذية الضوئية. وتستغرق عملية الاخضرار هذه وقت طويل نسبياً قد تستغرق ٨ أسابيع للوصول إلى أعلى محتوى كلوروفيل بالمقارنة مع النباتات الكاملة التى تنقل من الظلام إلى الضوء. وتعتمد القدرة على تكوين الكلوروبلاست على وجود الخلايا غير المنقسمة فى كتل الخلايا. وتكوين المناطق الخضراء فى كتل الكالس يعتبر بداية عملية التكشف (George, 1993)

لكن على الرغم من عدم أهمية الإضاءة بالنسبة لعملية البناء الضوئى حتى إذا كانت المزرعة تحتوى على نباتات خضراء فإن نوعية وطريقة توزيع الإضاءة فى غرفة النمو له تأثير فعال على نمو المزرعة وجودة النباتات. وليس الأمر كذلك فحسب بل يمكن بتعديل شدة ونوعية الإضاءة التحكم فى نمو وتكشف مزارع البطاطس بطريقة تحاكي فعل منظمات النمو التى تقف وراء معظم التغيرات الوراثية فى مزارع القوارير (Seabrook, 2005). وترجع التأثيرات المختلفة للضوء على النباتات من حيث النمو

والتطور عموماً إلى وجود نظامين متخصصين لاستقبال الطاقة الضوئية الأول blue light/UV-A والثاني مستقبل UV-B وهما يتأثران بنوعية وكمية الإضاءة. لكن على العكس من تأثير الضوء على النبات الكامل فإن المعلومات حول تأثير الضوء وبالأخص نوعية الضوء على مزارع الأنسجة لا تزال قليلة (Burritt & Leung, 2003) رغم إشارة الكثير من المراجع إلى أهمية الضوء في مزارع الأنسجة.

وغالباً تستعمل لمبات الفلورسنت التي تثبت أفقياً فوق المزارع وأسفل الأرفف التي تحمل أوعية الزراعة للحصول على الإضاءة المناسبة وبطول موجي ٤٠٠-٧٠٠ نانوميتر. وتزود بعض الغرف أحياناً باللمبات العادية للحصول على جزء من الطول الموجي للمنطقة الحمراء. ويطلق على شدة الإضاءة المستعملة في غرف النمو والتي تقاس حديثاً بوحدات ميكرومول/م²/الثانية (Photon flux density (PFD) وحتمًا تؤثر نوعية اللمبات وعددها وبعدها عن الأوعية على الطاقة الضوئية التي تصل إلى النباتات أو الأنسجة المنزرعة. وبالطبع يجب ألا ننسى نوعية الأوعية المستعملة في الزراعة وكذلك الأغذية ومدى نفاذيتها للضوء، فمهما كانت نوعية الأوعية والأغذية فلا بد وأن تقلل من انتشار الضوء في غرفة النمو وانتقاله من وعاء إلى آخر (Fujiwara et al. 1989). ومن العوامل التي تؤثر أيضاً في الإضاءة في غرف النمو موضع الأوعية على الأرفف ونوعية المادة المصنوعة منها وتأثيرها على امتصاص أو انعكاس الضوء (Nguyen & Kozai, 2005).

ويشير (Chen 2005) أن تكاليف استهلاك الكهرباء في مزارع الأنسجة تصل إلى ٦% من التكاليف الكلية وتصل تكاليف إضاءة غرف الزراعة إلى ٦٥% من هذه القيمة أما الـ ٣٥% الباقية فهي تكاليف التبريد. وللحد من تكاليف الإضاءة يمكن استعمال مزيداً من الأرفف لكن بسبب ذلك عدم انتظام في توزيع الإضاءة للأوعية المختلفة. ومن البديهي أن الإضاءة المستعملة في غرف النمو ينتج عنها قدر كبير من

الحرارة التي يجب التخلص منها بالتبريد مما يزيد تكاليف الإنتاج. وللحد من ارتفاع درجات الحرارة يتم وضع اللببات خارج غرف النمو وتنقل الأشعة الضوئية بعد التخلص من طاقتها الحرارية خلال ألياف زجاجية إلى غرف النمو أو يتم النقل باستعمال عدسات لتركيز الأشعة ثم تنقل لغرفة النمو. وبالطبع تلك طرق مكلفة لكن من الناحية التطبيقية يجب تثبيت مصدر الإضاءة في منطقة وسطى وغير ملاصقة للأرفف الحاملة للأوعية. كما يمكن وضع اللببات فقط داخل الغرف أما الأجزاء الملحقة بها والتي تولد قدراً كبيراً من الحرارة فتوضع خارج الغرفة. وفي بعض المعامل الكبرى يتم توزيع غرف النمو بحيث تكون فترات الإضاءة والإظلام فيها مختلفة ويتم سحب الهواء الساخن الموجود في الغرف المضاءة ليستخدم في تدفئة الغرف غير المضاءة وبالتالي الحد من تكاليف التبريد والتسخين (George, 1993).

وتتعدد صور تأثير الضوء على نمو وتكشف النباتات وبعض العمليات الفسيولوجية المختلفة في مزارع الأنسجة. والتي قد لا تتطلب امتصاص قدر كبير من الطاقة الضوئية لكن يمكن تحفيزها بالتعرض للضوء لمدة قصيرة. وقد يكون التأثير الضوئي غير مباشر عن طريق انتقال تأثيره في النبات الأم إلى المستأصل النباتي أو مباشر على المستأصل النباتي. وجد (Burritta & Leung, 2003) أن حفظ النبات *Begonia erythrophylla* الأم في أطوال موجية مختلفة لمدة أسبوعين قبل بدء زراعة الأنسجة يؤثر بشدة على معدل استجابة أعناق الأوراق للبيئة وكذلك على عدد البراعم المتكشفة. فيذكر أن كل المستأصلات تقريباً كانت ذات قدرة على إنتاج حوالي 30 نبات لكل مستأصل عندما نمت الأم في الضوء العادي أو الأحمر، بينما انخفضت هذه النسبة إلى 35 و 30 و 7% عند نمو النبات الأم في الضوء الأحمر البعيد والظلام والضوء الأزرق على التوالي، وكان عدد الأشطاء 15 و 10 و 3 لكل مستأصل. ومن الجدير بالذكر أن عدد كبير من المستأصلات التي أخذت من أمهات نمت في الظلام ماتت عقب الزراعة بسبب زيادة تخليقها لمركبات عديدة الفينول. ومن الدراسة

التشريحية وجد أن التثبيط يحدث لمرحلة تكوين الخلايا الميرستيمية وليس لتطور منشآت الأشطاء. ولم يكن التثبيط الحادث بسبب الضوء الأزرق راجع مباشرة إلى نظام الفيتوكروم لتكشف عدد من الأشطاء عند الزراعة تحت خليط من الضوء الأزرق والأحمر. وعلى العكس من التثبيط الحادث من الضوء الأحمر البعيد كان التثبيط بالضوء الأزرق غير قابل للانعكاس.

وعموماً لا يثبط الضوء نمو معظم الأعضاء النباتية بل قد يكون ضرورياً للنمو الأمثل. تختلف الحاجة للضوء على حسب مرحلة المزرعة فأحياناً يتطلب الأمر بدء المزرعة في الضوء ثم نقلها للظلام أو العكس لحدوث استجابة معينة. فعلى سبيل المثال يتطلب إنتاج درنات دقيقة الحجم microtubers من بعض أصناف البطاطس زراعة النبيتات في الظلام عقب تشجيع نمو السيقان في الضوء (Piao et al., 2003). وأيضاً يلزم تطور أفرع من البراعم الزهرية لنباتات Freesia بدء المزرعة في الظلام ثم نقلها إلى الضوء (Bach, 1987). لكن استنتج Clayton et al. (2003) عند الحاجة إلى الضوء في المراحل الأولى من زراعة القمم النامية الموز. أما Zambre et al. (2003) فيشير إلى أهمية الضوء في عملية نقل الجينات عند استعمال بكتيريا *Agrobacterium* في التحويل الوراثي للفاصوليا والارابيدوبسيس. وينظر إلى تأثير الضوء على زراعة الأنسجة من ثلاثة أوجه وهي:

أ. الطول الموجي

يتكون الضوء العادي من عدة أطيايف يمكن فصلها عن بعضها البعض ودراسة تأثير كلا منها على النمو والتكشف، لكن المتبع في معظم حالات زراعة الأنسجة هو الإضاءة بلمبات الفلورسنت. والأطوال الموجية التي تؤثر على الكشف في القوارير كما ذكر Hart (1988) هي القريبة من فوق البنفسجية (300-380 نانوميتر)، الزرقاء (430-490 نانوميتر)، والحمراء (640-700 نانوميتر)، والحمراء البعيدة

(٧٠٠-٧٦٠ نانوميتر) أما الأطوال الموجية من ٤٠٠-٧٠٠ نانوميتر في المؤثرة في البناء الضوئي. ويتوقف الطول الموجي الذي تستقبله المزرعة على نوعية اللمبات المستخدمة وكذلك على نوعية الأوعية في غرف النمو. وتنتج لمبات الفلورسنت كمية أقل من الضوء الأحمر البعيد بالمقارنة مع لمبات الصوديوم. وتعتبر الأولى مناسبة لغرف الزراعة عند تثبيتها موازية للأرفف وعلى ارتفاع ٤٠-٥٠ سم من سطح المزرعة (Nguyen & Kozai, 2005). وتؤثر النسبة بين الطاقة الضوئية في منطقة الضوء الأحمر والأحمر البعيد وكذلك نسبة الفوتونات في المنطقة الحمراء إلى الزرقاء على النمو والتكشف. وقد ذكر (Nguyen & Kozai, 2005) تشجيع تجذير عقل أشجار *Azalia* عند استخدام الضوء الأحمر أو الأحمر البعيد وليس الضوء الأبيض البارد باستعمال لمبات الفلورسنت. كذلك شجع الضوء الأحمر تكوين الأشطاء ونموها في مزارع الجزر بينما تثبيط نمو الجذور من الأجنة الجسدية. ومن هذا يتضح مدى التباين بين تأثير الضوء الأحمر والأحمر البعيد والأزرق على الكشف، وربما يرتبط ذلك بالنوع النباتي (Burritta & Leung, 2003).

بدراسة الكشف في بعض النباتات وجد أن الضوء الأحمر يتحكم في السيادة القمية بينما يتحكم الضوء الأزرق في عدد البراعم التي تتكون على المستأصل عبر نظام استقبالي مختلف (Muleo et al., 2001). وكذلك وجد (Kintzios et al., 2000) أن حفظ مزرعة أوراق نباتات *Capsicum annuum* لمدة ثلاثة أسابيع عقب الزراعة في الظلام يزيد من عدد الأجنة الجسدية. لكن قد يتداخل تأثير الضوء مع العوامل الأخرى التي سبق الإشارة إليها حيث كان عدد الأجنة المتكون من الورقة الثالثة أقل من ذلك العدد المتكون من الورقة الأولى أو الثانية. لم يكن هناك فرق في عدد الأجنة المتكون في أنسجة من الورقة الثانية والثالثة عند حفظ المزرعة تحت ٦/١٨ ضوء/ظلام.

ونوه عدد من الباحثين إلى أن حفظ المزرعة في ضوء خافت يساعد على تكوين الأجنة الجسدية وتكشف الأخطاء في عدد من النباتات مثل *Cucumis melo* و *Rosa* و *C.sativus*. لكن تختلف هذه المدة وشدة الإضاءة المثلى باختلاف الأنواع. وعلى الرغم من أن كالس الدخان يستجيب إيجابياً إلى الإضاءة المنخفضة الزرقاء أو القريبة من فوق البنفسجية فإن الكشف والنمو الأمثل للأخطاء يحدث عند التعرض إلى الضوء الكامل أو منطقة الضوء الأحمر. وغالباً يتم تنشيط تكوين الكالس في الظلام وبعد ذلك ينقل إلى الضوء لدفعه للكشف. وقد يؤدي الضوء الأزرق بكثافة عالية إلى تثبيط انقسام خلايا الكالس. ويرجع ذلك إلى التداخل بين منظمات النمو خاصة الأوكسينات والأطوال الموجية المختلفة، ففي مزارع Artichoke يزيد 2.4-D من حساسية الخلايا للضوء وفي غيابه لا يحدث التأثير المثبط للضوء. والأكثر من هذا يوجد طور معين في مرحلة انقسام الخلايا يكون حساساً للضوء دون غيره من أطوار الانقسام حيث يؤثر الضوء على تضاعف المادة الوراثية للخلية (George, 1993). وقد فسرت تأثير الضوء على مرحلة الكالس والتكشف بعدد من التفسيرات (George, 1993) و (Seabrook, 2005):

- زيادة إنتاج المواد الفينولية التي تعيق نشاط معظم منظمات النمو.
- هدم إنزيم السيتوكروم أكسيداز المشترك في عملية التنفس.
- تكسير الحديد غير المخلبي وكذلك أكسدة المركبات المخلبية في البيئة.
- تنشيط تخليق حامض الجبريللين وقد تأكد ذلك بالتغلب على التأثير المثبط للضوء بإضافة إحدى المواد المثبطة لتخليق الجبريللين.
- قد يسبب الضوء رفع الرقم الهيدروجيني لبيئة MS إلى ٧.
- تثبيط تخليق السيتوكينينات وتنشيط هدم أندول حامض الخليك وحامض الأبسيسك.

• يؤثر التفاعل بين الضوء الأحمر و IAA على تثبيط نمو الأَشْطاء وتكوين الدرنات في البطاطس. بينما يشجع الكنيتين في وجود الضوء الأزرق تكوين الدرنات.

ومن التأثيرات الواضحة أيضاً للطول الموجي في زراعة الأنسجة ما لوحظ عند زراعة عقل ساقية من البطاطس تحتوي على برعم واحد في غرف مضاءة بلمبات فلوريسنت أو لمبات عادية. فكانت النباتات الناتجة من استخدام الللمبات العادية أطول سَوْفاً وأوراقها أكبر حجماً وأكثر عدداً. وفي العديد من النباتات المنزوعة معملياً يمكن أن ينعكس تأثير الضوء الأزرق عندما يتبع بالضوء الأحمر الذي قد يعطى تأثير مشابه للسيتوكينينات في تكشف الأفرع، لكن بعض الدراسات أثبتت أن بعض النباتات لها استجابة مخالفة لذلك. وللضوء تأثير على عملية تكوين الجذور في زراعة الأنسجة لكن يقع ذلك تحت نظام تحكم فيتوكرومي آخر خلاف النظام المؤثر في تكشف الأفرع. وتوجد صبغات الفيتوكروم في صورتين Pfr والتي تنكسر أثناء فترة الظلام أو التعرض للضوء الأحمر البعيد وتتحول إلى الصورة الأخرى المعروفة ب-Pr. ولوحظ أن النباتات النامية في نهار طويل تحتوي على كمية أعلى من IAA مقارنة بتلك النامية تحت النهار القصير. فتعريض مزارع *Polianthus tuberosa* لطول موجي ٦٦٠ انجستروم ينشط تكوين الجذور على الأفرع. لكن كانت أحسن ظروف لتجذير نباتات *Rhododendron* الناتجة من زراعة الأنسجة هو تعريض الأفرع لمدة أسبوعين للأشعة الحمراء البعيدة ثم الأشعة الحمراء لمدة أسبوعين (George, 1993).

قارن (Nhut et al. 2003) تأثير استعمال الضوء الأزرق أو الأحمر مع ضوء الفلوريسنت العادي على نمو أفرع مكونة من ثلاث وريقات ناتجة من زراعة أنسجة نباتات الفراولة صنف 'Akihime' حيث زرعت الأفرع في بيئة MS الخالية من السكر وفي جو مشبع بغاز ثاني أكسيد الكربون لحث الأفرع لتكون ذاتية التغذية الضوئية. وتم استعمال مصدر للضوء الأحمر أو الأزرق من النوع light emitting

(LED) diodes، ويمتاز هذا النوع من المصابيح بصغر حجمه وتركيبه الصلب وطول عمره. وكانت الكثافة الضوئية في جميع الحالات ثابتة وقدرها ٤٥ ميكرومول/م²/ثانية. وبعد أربعة أسابيع من النمو لم يلاحظ تغيير في طبيعة النمو بين النباتات النامية تحت الأنواع المختلفة من الضوء كما في جدول رقم (٤-١١). ويتبين أن الضوء الخليط من الأحمر والأزرق كان أفضل لنمو النباتات لكن لم يكن هناك فرق معنوي في عدد الجذور عند استعمال أطوال موجية مختلفة.

جدول ٤-١١: تأثير نوعية الضوء على نمو أفرع من نباتات الفراولة الناتجة من زراعة الأنسجة (Nhut et al., 2003).

نوع الضوء	عدد الأوراق	الوزن الجاف الجذور	الوزن الجاف الخضرى	الوزن الطازج الجذور	الوزن الطازج الخضرى	محتوى الكلوروفيل*	طول الجذور (سم)	عدد الجذور	طول النبات (سم)
أحمر	٠.٣	١٣.١	١.٥	١٨٠.٨	٣٢.٩	١.٣	١.٥	٦.٢	٣.٨
أزرق	١.٥	١٥.٤	٤.٣	١٨٥.٩	٣٥.١	٢.٠	٢.٧	٧.٩	٤.٣
خليط	٠.٩	١٦.٣	٧.٦	١٧٦.٩	٣٩.٦	٢.٨	٢.٧	٧.١	٤.٦
فلورسنت	٠.٥	١٦.٨	٥.٥	١٦٨.٠	٣٨.٠	٢.٣	٢.٩	٦.٥	٤.٠

*محتوى الكلوروفيل فى الورقة الثالثة من أعلى لأسفل مقدرة بوحدة SPAD

هذا وقد أوضح (Le-Guen Le-Saos et al., 2002) أن نوعية الضوء المستعملة فى غرف النمو لها تأثير على تكوين الأنبصال، حيث قام بمقارنة تكوين الأنبصال فى نباتات *Allium cepa* تحت ضوء الفلورسنت وخليط مكون من الضوء الفلورسنت وضوء المصابيح العادية والمعروفة باسم Incandescent. وبعد شهر من زراعة الأجزاء النباتية لوحظ أن هناك فروقا معنوية فى الشكل الظاهرى بين المجموعتين وازداد هذا الفرق بتقدم عمر المزرعة. ولم يزد معدل التبصيل فى النباتات النامية تحت ضوء الفلورسنت عن ٢% أما بعد ٣٠ يوم من النمو فى الضوء الخليط

ارتفع معدل تكوين الأصيل إلى ٨٩% وأصبحت ١٠٠% بعد ٩٠ يوم. وتلازمت الزيادة في معدل تكوين الأصيل بالزيادة في الوزن الرطب والجاف للأصيل. وجفت الأوراق تماماً بعد ٩٠ يوماً مما يعنى تمام نضج الأصيل المتكونة. وقد وضع تأثير الأسرار السخية المختلفة على نمو وتكوين الدرقات في البطاطس (Seabrook, 2005).

١.٢ طول الفترة الضوئية

ويقصد بها تعاقب فترة الضوء والظلام خلال الأربع والعشرين ساعة وهي تؤثر في النبات مباشرة إما عن طريق تنظيم كمية الطاقة الضوئية المعرض لها النبات أو عن طريق التأثير في ميكانيكيات أخرى داخل النبات بحيث يدرك بها التغيير في الظروف البيئية. ومن المعروف أن فترة الظلام هي الأهم وليس طول فترة الإضاءة وقد عرض (Seabrook, 2005) مزارع البطاطس لفترات ضوء/ظلام بالطريقة التالية: ٨/١٦ و ١/٤ و ٠.٥/١ بحيث كانت كمية الطاقة الكلية ثابتة خلال اليوم. وكان الوزن الجاف أعلى عند تقصير فترات الإضاءة. لوحظت الاستجابات الآتية للنباتات النامية تحت ظروف طول الفترة الضوئية في مزارع الأنسجة:

- أدى النهار الطويل إلى تكوين عدد أكثر من أفرع *Pelargonium* وكانت الأفرع أكثر سمكا ووزنا واحتواء على الكلوروفيل بالمقارنة مع تلك النامية في النهار القصير.
- يكون معدل نمو الجذور أفضل في اليوم القصير ولكن هذه الظروف تؤدي إلى الاستطالة الإظلامية للأفرع مما يقلل من نسبة نجاح الأقمرة. وعموماً يمكن التغلب على هذه المشكلة بجعل الجزء المحتوى على البيئة من وعاء الزراعة مظلم وذلك إما بتغطيتها بورق المونيوم أو إضافة الفحم النباتي.
- رغم أن نسبة تكشف الأفرع تزداد في اليوم الطويل فإن عدد ساعات الإضاءة الأمثل يختلف من نوع نباتي إلى آخر. وليس من الواضح ما إذا كان هذا التأثير الإيجابي راجعاً إلى عدد ساعات الإضاءة أم إلى ساعات الإظلام.

- لا يتحول الكالس الناتج من أنسجة بعض النباتات مثل نبات *Pelargonium* إلى اللون الأخضر ولا يتم فيه التكشف في الضوء المستمر لكن يتم التحول إلى اللون الأخضر والتكشف عند التعرض لـ ١٥-١٦ ساعة فقط ضوء يوميا.

ج. شدة الإضاءة

وتعني الكثافة الضوئية التي تتعرض لها المزرعة وهي مختلفة عن الطول الموجي والفترة الضوئية، وتؤثر شدة الإضاءة على كمية الطاقة الضوئية الكلية التي تستقبلها المزرعة. وتلعب الكثافة الضوئية دور هام في تكوين الكلوروفيل في الكالس والأنسجة المنزرعة وبذلك تعتبر عاملاً محدد للنمو خاصة في المزارع الذاتية التغذية إذ تزيد شدة الإضاءة من عملية البناء الضوئي. إلا أنه لا يعتمد على عملية البناء الضوئي في زراعة الأنسجة، حيث أن شدة الإضاءة المستعملة في غرف زراعة الأنسجة تكون أقل عشر مرات عن تلك الموجودة في الظروف الطبيعية، وكمية الضوء النافذة خلال الأوعية والأغطية تكون أقل من تلك التي يتم قياسها في غرفة النمو. بالإضافة لاختلاف الطول الموجي للضوء المستعمل عن الضوء العادي. ويحذر الإشارة هنا إلى ضرورة قياس شدة الإضاءة باستمرار في غرف النمو حيث أن شدة الإضاءة الناتجة من لمبات الفلورسنت الشائع استعمالها تنخفض بطول فترة استعمالها. وقد قدر هذا الانخفاض بحوالي ٧% بعد ٨ أيام و ١٤% بعد ٤ شهور و ٣٠% بعد ١٢ شهر من الاستعمال. لذا يجب تغيير لمبات الإضاءة على فترات لا تتجاوز الأربعة أشهر.

وقد قام Kitaya et al. (1995) بقياس تأثير شدة الإضاءة التي تصل إلى مزرعة بطاطس ذاتية التغذية الضوئية ولاحظ أن نمو الأشطاء والشكل الظاهري للنباتات يختلف على أساس طريقة وضع مصدر الضوء. والشائع تركيب اللمبات أعلى المزرعة لكن هذه الطريقة ليست هي الأفضل لنمو المزرعة. بل من الأفضل وضع الأوعية في صفوف ووضع اللمبات بجوارها مباشرة وقد لاحظ أن أشطاء البطاطس

في هذه الحالة كانت أقصر عن تلك عند استعمال الإضاءة من أعلى. لكن لم ينعكس ذلك على الوزن الرطب والجاف ولا على المساحة الورقية، رغم أن الكثافة الضوئية في داخل الأوعية هذه الحالة كانت أعلى خمس مرات عنها في حالة الإضاءة من أعلى، مع ثبات عدد اللببات في كلا الحالتين. وقد سجل زيادة في صفات السابقة برفع شدة الإضاءة إلى ٩٠ ميكرومول/م²/ث ثم انخفض النمو بزيادة شدة الإضاءة عن ذلك. لكن لم تشير الدراسة إلى درجة الحرارة داخل الأوعية التي ستتأثر حتماً بمكان وضع اللببات.

وبين (Economou & Read (1987 أن شدة الإضاءة المثلى تختلف باختلاف النوع النباتي، حيثي شجع الضوء تكوين الجذور والأشطاء في بعض النباتات بينما يثبط الضوء تكوين الجذور في البعض والراجع لتكسير IAA الداخلي (Schneider, 2005)، ويشير (Nguyen & Kozai (2005 أيضاً إلى أن تأثير الضوء يرتبط عالمياً بكمية ثاني أكسيد الكربون المتاحة وكمية السكر بالبيئة. وربما تسبب الكثير من النباتات إلى زيادة شدة الإضاءة خاصة في المزارع ذاتية أو خلطة التغذية الضوئية (أنظر الفصل التالي) فبرفع شدة الإضاءة إلى ٢٠٠ زاد عدد الأوراق وكمية

الكلوروفيل ومحتوى السكر وصافى عملية البناء الضوئي لنباتات *Limonium* وكذلك زاد معدل الأقلمة بالمقارنة مع حفظ المزرعة ذاتية التغذية الضوئية عند شدة إضاءة نصف السابقة. لكن لم يتأثر النمو بشدة الإضاءة في المزارع الغير ذاتية التغذية (Lian et al., 2002). لكن بزيادة الكثافة الضوئية إلى ٢١٠ تسبب التثبيط الضوئي لعملية البناء الضوئي في انخفاض نمو وتكثف أشطاء نباتات *Cynara scolymus* كما يشير (Schneider, 2005). وقد قام (Nhut et al. (2003 في نفس التجربة التي سبق الإشارة إليها عند الحديث عن نوعية الضوء بمقارنة ثلاث كثافات ضوئية ٤٥، ٦٠ أو ٧٥ ميكرومول/م²/ثانية وذلك بخلط ١٠% من الضوء الأزرق مع ٩٠% من الضوء الأحمر. وتوضح النتائج المبينة في جدول رقم (٤-١٢) أن ارتفاع النباتات وعدد

الجنور كان أفضل في الكثافة المنخفضة بينما كان عدد الأوراق وطول الجنور والوزن الرطب للنبات ومحتوى الكلوروفيل أعلى في الكثافة الضوئية المتوسطة.

جدول ٤-١٢: تأثير الكثافة الضوئية على نمو أفرع من نباتات الفراولة الناتجة من زراعة الأنسجة.

ارتفاع النبات (سم)	عدد الجنور	طول الجنور (سم)	محتوى الكلوروفيل	وزن جاف (جم)		وزن طازج (جم)		الكثافة الضوئية ميكرومول/م ² /ثانية
				الجنور	الأوراق	الجنور	الأوراق	
٦.٩	٣.١	٢.٠	٣٦.١	١٤	٠.٤	١٧٧	٤.٤	٤.٢
٧.٣	٢.٩	٢.٣	٣٨.١	١٧	١.٦	١٨٤	٦.٣	٤.٥
٦.٩	٢.٨	٢.٤	٣٧.٤	١٧	٠.٥	١٧٢	٥.٥	٤.١

*محتوى الكلوروفيل في الورقة الثالثة من أعلى لأسفل مقاس بوحدة SPAD

وفي عدة دراسات لتأثير شدة الإضاءة على مزارع الأنسجة أشار (George, 1993) إلى التأثيرات الآتية:

- أدت شدة الإضاءة إلى تنشيط نمو الكالس في بعض أنواع *Pelargonium* بسبب زيادة إنتاج المواد الفينولية وتنشيط تخليق الهرمونات.
- تحتاج أصناف محددة من *Chrysanthemum* دون الأصناف الأخرى إلى كثافة ضوئية عالية لتكوين أشطاء. وبعض الأصناف تحتاج إلى كثافة عالية في البداية ثم كثافة منخفضة.
- يتطلب تكوين البراعم الزهرية في أغلب النباتات كثافة ضوئية عالية بالإضافة إلى أهمية الفترة الضوئية.

٧. المجال الكهربائي والمغناطيسي

لقد نال تأثير المجال المغناطيسي والكهربائي المغناطيسي electromagnetic field (EMF) سواء الثابت أو المتردد وبالأخص ذو التردد العالي اهتمام بعض الباحثين في مجال زراعة الأنسجة في الآونة الأخيرة، وذلك لما عرف من تأثيره

المقايين علي النباتات والحيوانات والكائنات الدقيقة (Atak et al., 2007). ومن الثابت أنه يؤثر علي إنبات الكثير من البذور ونمو البادرات (Ruzic et al., 1993) وقد سجل الكثير تأثيراته الايجابية علي النمو والإنتاج للعديد من المحاصيل. فقد وجد Singh et al. (1996) تغيير في تركيب الماء عند تعريض لمجال مغناطيسي كهربى قوته 50Hz وبذلك تحدث تغييرات مورفولوجية وسيتولوجية في الخلايا. وأشارت أبحاث كثيرة الى أن EMF يغير من خواص الغشاء الخلوى ونفاذيته للأيونات وبالتالي جميعها داخل الخلية ومن ثم تأثيرها على الضغط الأسموزى، والتعبير الجينى، وتخليق البروتين، ونشاط الإنزيمات، والعديد من عمليات الأيض (Stange و Phillips et al., 1992) (et al., 2002) و (Hirota et al., 1999) و (Răuciu et al., 2008). لكن رغم اثبات البعض تأثير المجال المغناطيسى على مزارع الأنسجة فإن التفسير الدقيق لذلك لم يحدد بشكل تام (Dao-liang et al. 2009).

ويشير (Atak et al. 2007) أن الدراسات السابقة بينت حدوث تغيير في طول مرحلة التهيؤ الأول G1 للخلايا الميرستيمية عند تعريضها لمجال مغناطيسى. وتزامن ذلك مع معدل عالى من تخليق البروتين و RNA وقد قدرت عدد الإنزيمات التى تأثرت في تلك الدراسات بحوالى ٥٠ إنزيم من بينها تلك المنوط بها تكوين الشوارد الحرة أثناء تفاعلات الهدم وأخرى مثل البيروكسيدز المعروف بدورة في مقاومة الإجهاد الملحى والمانى. ولا يتوقف دور البيروكسيدز عند هذا الحد بل لها علاقة غير مباشرة بالتكشف في مزارع الأنسجة من خلال تأثيرها على أيض الأوكسينات والسيتوكينينات (köse. 2007). إلا أنه بتعريض معلق خلايا الدخان في مرحلة النمو اللوغارتمى لمجال مغناطيسى ثابت شدته 10 mT أو 30 mT لمدة خمس ساعات في اليوم وقف نمو الخلايا وزاد معدل الموت وتزامن ذلك مع نشاط إنزيم البيروكسيدز وتكوين اللجنين في الخلايا (Abdolmaleki et al., 2007).

زرع (2009) Dao-liang *et al.* العقد الساقية لأشجار *Prunus maritime* بعد تعرضها لمدة عشر دقائق لمجال مغناطيسي يتراوح بين ٤٨ و ١٥٥ كيلو أمبير/دقيقة. ووجد أن تعريض العقد الساقية لمجال شدته ٩٧ ضاعف معدل تكشف الأشطاء لكن انخفض عدد الأشطاء عند زيادة شدة المجال عن ٩٧. وبالمقارنة مع الشاهد ارتفع معدل الكشف ٣.٢ ضعف حيث وصل عدد الأشطاء إلى ١٧ لكل مُستأصل نباتي عند التعرض لمجال شدته ٩٧. ولم يتوقف الأمر عند ذلك بل كان للمعاملة تأثير إيجابي على وزن وطول الأشطاء والجذور. ومن الجدير بالذكر أن النسبة بين الوزن الرطب والجاف للأشطاء توضح ثبات معدل امتصاص الأيونات رغم زيادة امتصاص الماء عند التعرض للمجال المغناطيسي. درس Rakosy-Tican *et al.* (2005) تأثير تعريض مزارع العقد الساقية والقمم النامية لصنف البطاطس Désirée لفترات مختلفة وفي مواعيد مختلفة من عمر المزرعة لمجال مغناطيسي ضعيف جداً. وقد تبين التأثير بين تثبيط وتشجع لنمو الأوراق والسوق والجذور على أساس مدة التعرض للمجال هل ١٤ أم ٢٨ يوم. وقد تأثر محتوى الأوراق من صبغات البناء الضوئي. وقد لاحظ أيضاً اختلاف في معدل نمو الأوراق على العقد الساقية لأجناس البطاطس البرية *Solanum chacoense* و *S. microdontum* و *S. verrucosum*. عقب تسعة أيام من التعرض للمجال. إلا أن عدد القمم الميرستيمية في المُستأصل والمغناطيسية الأرضية geomagnetic كان ذو تأثير معنوي في استجابة المزرعة.

كما اهتم البعض بدراسة تأثير المجال المغناطيسي والذي قد يتولد طبيعياً نتيجة مرور التيار الكهربى في غرف النمو أو بوضع المزارع داخل مجال مغناطيسي. فلا يقف تأثير الإضاءة الموجودة في غرف النمو على النمو والتكشف بفعل الضوء فقط لكن يتولد من ملحقات لمبات الفلورسنت وهى الأكثر شيوعاً فى الاستخدام مجالاً مغناطيسياً. وتتفاوت شدة هذا المجال عند الأرفف المختلفة في غرف النمو على أساس القرب أو البعد عن المصدر. وأدى التعرض لمجال مغناطيسي كهربى إلى زيادة الأفرع

ونسبة التجذير وطول الأشطاء ووزنها فى نباتات *Prunus cerasifera* وزاد عدد الأشطاء والجذور فى نباتات *Aloe arborescens*. ولوحظ انخفاض فى عدد الأجنة الجسدية المتكونة وكذلك نسبة إنباتها فى *Quercus suber* عند وضعها فى مجال ضعيف قدره 50 Hz, 15 mT ويتوقف مدى هذا الانخفاض على التركيب الوراثى المستعمل. وقد أرجع ذلك إلى تأثير المجال الكهربى على القطبية (Celestino et al., 1998).

وفى بعض الدراسات وجدت زيادة كبيرة فى نمو الكالس الناتج من زراعة أنسجة نبات الدخان عند تمرير مجال كهربائى ضعيف شدته ١ ميكروامبير بين الأنسجة المنزرعة والبيئة. ويتوقف هذا التأثير على موقع الطرف السالب والموجب للتيار فعندما جعل الكالس ناحية القطب السالب زاد نموه بمقدار ٧٠% وعند عكس اتجاه التيار كانت الزيادة قليلة جداً.

الفصل الخامس

مرحلتى تأسيس المزرعة والأقلمة

قد تصل نسبة التلوث فى مزارع الأنسجة إلى ١٠٠%، وبذلك يعد التلوث من أخطر العوامل التى لا تؤدى فقط إلى ارتفاع تكاليف الإنتاج بل إلى فقدان بعض التراكيب الوراثية التى قد يصعب الحصول عليها مرة أخرى أو يستغرق وقتاً طويلاً للحصول عليها. ولكى يستمر المُستأصل النباتى فى الحياة والنمو فى القوارير لابد وأن يكون خالياً من الإصابة بالحشرات والفطريات ومعظم أنواع البكتيريا. ولذا يصبح من الأهمية القصوى المحافظة على المعمل بما يحتويه من أراضيات وحوائط وهواء خالياً من الأتربة والتلوث بالجراثيم المختلفة. ويتضح من النظر لتركيب وسط النمو المستعمل فى زراعة الأنسجة مدى صلاحيته لنمو العديد من الكائنات الحية الدقيقة لاحتوائه على العديد من العناصر المعدنية والعضوية لاسيما التركيز المرتفع من السكر المحفز لنمو تلك الكائنات. ويمكن ملاحظة النمو السريع لبعض هذه الملوثات وقضائها على المُستأصل النباتى تحت الظروف المثلى للنمو خلال بضعة أيام من تأسيس المزرعة. وفى بعض الحالات يحدث نمو للملوثات داخل المُستأصل النباتى وذلك باستهلاكه للمواد الغذائية وإفرازه لبعض المركبات السامة التى تدمر النسيج النباتى. وقد تتحول الملوثات السطحية epiphytic والتى يسهل قتلها إلى داخلية endophytic أثناء جمع وإعداد المُستأصلات النباتية أو إعادة تقسيم المزرعة (Gunson & Spencer- Phillips, 1994) ومن ثم يتطلب الأمر استعمال بعض المركبات التى تقتل تلك الملوثات داخل الأنسجة أو على الأقل توقف نموها.

وهناك أربعة مصادر للتلوث فى مزارع الأنسجة، وهى المُستأصل النباتى سواء كان التلوث به داخلياً أو سطحيّاً، والبيئة، والأدوات المستعملة فى فصل وزراعة المُستأصل النباتى، وأخيراً عدم الدقة أثناء إعداد وزراعة المزرعة. وربما يعزى سرعة انتشار الملوثات الفطرية عموماً و *Fusarium poe* على وجه التحديد إلى انتشار بعض

الحشرات كالنمل والتربس (Leifert & Cassells, 2001). وكقاعدة عامة يجب ملاحظة أن أي سطح أو جزء تم تعقيمه أثناء العمل يجب عدم تعريضه للتلوث مرة أخرى كان يلمس باليد أو بتحريك شيء آخر غير معقم فوقه أو بإعاقة حركة الهواء المعقم داخل كابينة العمل مما يسمح للهواء غير المعقم بالدخول إلى جو الكابينة. وسوف يتم تناول كل عملية من عمليات التعقيم بالتفصيل في الجزء التالي.

أولاً: تعقيم المُستأصل النباتي

هناك العديد من الكائنات الحية الدقيقة التي تعيش على أسطح النبات ويمكن أن تتخلل أنسجته عن طريق الفتحات الطبيعية كالثغور (شكل رقم ١-٥) أو الجروح بطبيعة الحال. ويعتبر المُستأصل النباتي من أهم مصادر التلوث في زراعة الأنسجة خاصة إذا كان النبات الأم ينمو في حقل مفتوح. ومن ثم يجب أن يعقم سطحياً للتخلص من هذه المسببات المرضية قبل زراعته. ومن حسن الحظ أن العديد من الملوثات السطحية ومنها الخمائر والكثير من أنواع البكتيريا والميكوبلازما يمكن التخلص منها بسهولة في عملية التعقيم السطحي إن لم تكن مغطاة تحت الشعيرات أو الزغب الموجود على السطح، لكن من الصعب التخلص من البكتيريا الموجية لصبغة جرام بصورة تامة في مزارع الإكثار الدقيق.



شكل ١-٥: يوضح الخلايا البكتيرية العصوية على سطح الورقة وداخل أحد الثغور
(<http://www.youtube.com/watch?v=ZBcs0hvnXgI>)

وأشار (Leifert & Cassells 2001) إلى أن تركيز الأملاح ونوعيتها والرقم الهيدروجيني للبيئة من العوامل التي تسبب وقف نشاط العديد من تلك الكائنات. ومن المعروف أن درجة الحرارة في غرف نمو مزارع الأنسجة أقل من ٢٥° م في معظم الحالات. وتلك أقل بكثير من درجة الحرارة المثلى لنمو أغلب الكائنات الدقيقة والتي ربما تزيد في الغالب عن ٣٥° م. وتعتبر هذه المرحلة شديدة الأهمية فإن لم يتم الكشف عن هذا التلوث بالطرق المعملية المعروفة في علم الكائنات الدقيقة فسوف يستمر التلوث في الانتقال من مزرعة إلى أخرى، وقد ينشط في إحدى مراحل الإكثار الدقيق بسبب استعمال مكونات نمو وهرمونات مختلفة أو حتى بعد النقل للحقل (Leifert & Cassells 2001). ولما كانت تلك الملوثات تحصل على احتياجاتها الغذائية من أنسجة النبات فإن الأنسجة المجروحة والتي تظهر عليها أعراض الشيخوخة أو تلك القريبة من غدد إفراز الرحيق تكون أكثر عرضة للتلوث (Preece, 1988)، ويجب تفادي أخذ المستأصلات النباتية من هذه الأجزاء أو إتباع طرق التعقيم السطحي التي تضمن خفض هذا التلوث بدرجة عالية مع استعمال بعض المضادات الحيوية للتغلب على الملوثات الداخلية. ويصاحب بقايا الحشرات على الأنسجة النباتية والأسمدة العضوية حمل ميكروبي عالى.

وتتوقف نسبة التلوث على نوع المستأصل النباتي فالأجزاء الأرضية كالأبصال والريزومات والكورمات أكثر عرضة للتلوث من الأجزاء الخضرية الغير ملامسة للتربة. كما أن لحجم المستأصل النباتي دوراً في نسبة التلوث، فالقمم الميرستيمية غالباً خالية من معظم الملوثات على العكس من الأجزاء الأكبر حجماً. وعموماً الأنسجة المسنة يكون التلوث فيها أعلى من الحديثة وقد لاحظ (Enjalric et al. 1988) انخفاض معدل التلوث في القمم النامية لنبات Hevea بالمقارنة مع الأجزاء المسنة. لكن العديد من الكائنات الحية الدقيقة الموجودة خلال المسافات الخلوية قد لا تتأثر بالتعقيم السطحي وتستطيع النمو والانتقال بتقسيم المزرعة. وقد يلاحظ عودة بعض الكائنات الحية الدقيقة للنشاط في المرحلة الرابعة من زراعة الأنسجة حيث تستخدم بيئة ذات تركيز منخفض

من الأملاح والسكر. ويوضح Sessitsch *et al.* (2002) قدرة التعقيم السطحي على التخلص من معظم الفطريات والبكتيريا إلا أن الفيروسات وكذلك الفيروسات تظل موجودة في أنسجة النباتات وتنتقل عبر عملية الإكثار الدقيق في حالة ما إذا كانت النباتات الأم مصابة. كذلك قد تحمل بذور بعض النباتات الفيروسات والبكتيريا والفطريات الداخلية إلا أنه من السهل معرفة التلوث الداخلي للبذور حيث سرعان ما تنبت الجراثيم بمجرد الزراعة في البيئة.

وبالطبع يختلف معدل التلوث الميكروبي باختلاف مكان النمو والمناخ السائد، فالأفرع النامية في جو رطب ودرجة حرارة عالية نسبياً تكون أكثر عرضة للتلوث عن تلك النامية في جو جاف وحرارة منخفضة وبالتالي يتباين التلوث باختلاف فصول السنة (George, 1993). والمستأصل النباتي إما أن يكون مصدره نباتات نامية في الحقل أو نباتات نامية في بيوت محمية متحكم في ظروفها الجوية. وفي الحالة الأولى تكون هناك فرصة كبيرة للتلوث إلا إذا كانت الأنسجة المستعملة مأخوذة من داخل أنسجة النبات وليس الأجزاء السطحية منه. فزراعة أجزاء من جذور الجزر أو درنات البطاطس على سبيل المثال تؤخذ من الجزء الداخلي بعد الغسيل الجيد والتقشير وفي مقارنة لعدد الجراثيم الموجودة على أزهار الطماطم النامية في حقل مفتوح، والبيت المحمي، وغرفة نمو وجد أن هذه الأعداد قبل التعقيم على التوالي هي ١٣٠٠٠٠٠، و ٨٥٥٢٠، و ٩٠ أما بعد التعقيم فكانت الأعداد ٩٢٢٠٠٠، و ١٦٠٠، و ٤٣ على الترتيب. أما نسبة التلوث بعد الزراعة فكانت ١٠٠، و ٦٠، و ٣٠% على التوالي (Pierik, 1987). وإن كان هناك ضرورة لاستخدام بعض النباتات الخشبية التي تنمو في الحقل تؤخذ الأفرع حديثة التكوين ويراعى ما يلي:

- مقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية الداخلية باستخدام مبيدات جهازية، وقد يترتب على ذلك تأثير المستأصل المنزرع عقب تأسيس المزرعة (Kritzinger *et al.* 1997). وتساعد الرطوبة المنخفضة في جو الصوبة وعدم ابتلال الأوراق بالماء على

الحد من التلوث، ومن الضروري ترك النباتات ليحفظ الماء الموجود على السطح قبل أن تعقم وتستعمل للإكثار.

• تؤخذ البراعم بما عليها من أوراق حرشفية بعد انتهاء فترة السكون مباشرة وقبل تفتحها وتحفظ في أكياس بولي إيثيلين في درجة حرارة منخفضة (٥ °م) حتى لا تجف إذا لم يتم استعمالها مباشرة.

• إذا كانت النباتات في طور السكون يتم التعقيم السطحي للأفرع باستعمال الكحول لمدة خمس ثواني ثم الكلوركس التجاري بتركيز ١٠-٢٠% لمدة ١٠ دقائق. توضع قواعد السيقان في محلول ٢% سكر و ٢٠٠ ملجم/لتر من 8-hydroxyquinoline citrate وتحفظ على درجة حرارة ٢٣ °م. ويضاف للمحلول السابق ٥٠ ملجم/لتر من حامض الجبريليك لكسر السكون إذا كانت السيقان جمعت في الخريف وقبل دخول الشتاء (Read, 1988)، وينصح بقطع حوالي ٢ سم من قاعدة الساق بعد يومين لتفادي انسداد الأوعية الناقلة. ثم تستعمل السيقان بعد تفتح ونمو البراعم.

• إن لم تكن النباتات في طور السكون تؤخذ الأفرع قبل بدء تفتح البراعم وتوضع في كأس به ماء في المعمل ويؤخذ النمو الحديث المتكون عقب ذلك.

• للحد من معدل التلوث عند استخدام النباتات النامية في الصوب الزجاجية يجب مراعاة الحفاظ على النباتات من الإصابة بالحشرات كالمن والتربس والعناكب لأنها مصادر لنقل العديد من الأمراض.

هذا وتوضح التجربة التي قام بها Watt et al. (2003) لنقل الأجزاء المنتخبة

من أشجار الكافور إلى المعمل لتأسيس المزرعة أن الطرق المختلفة للنقل تؤثر على معدل التلوث الحادث في هذه المرحلة، وبالتالي نجاح المزرعة. وكقاعدة عامة فإن الأجزاء الصلبة كالبذور والثمار يمكن تعقيمها بسهولة وبدون حدوث ضرر أما الأجزاء الغضة كالقمم النامية والبتلات فهي حساسة للتعقيم ويجب أن لا يؤدي التعقيم إلى موتها مع خفض المحتوى الميكروبي إلى أقل حد ممكن قبل نقلها للمعمل. أما الأجزاء الموجودة داخل تراكيب تحميها كالمبايض وهي غالباً خالية من التلوث السطحي، فيمكن تعقيم الأجزاء الخارجية ثم فصل المبايض وزراعتها مباشرة. ولما كانت البذور سهلة التعقيم فإنه يفضل ابتداء زراعة الأنسجة بتعقيم البذور سطحياً ثم زراعتها للحصول على

بإدرات معقمة تستعمل للزراعة (Razdan, 2002). ويجب أن تكون المواد المستخدمة في التعقيم السطحي رخيصة الثمن وغير سامة أو منخفضة السمية سواء للإنسان أو النسيج النباتي وذات مدى واسع من التأثير على الميكروبات.

التعقيم السطحي

الهدف منه التخلص من الملوثات السطحية epiphytic دون تلك الموجودة داخل الأنسجة. وقبل التعقيم يجب إزالة أى أجزاء جافة أو بقايا التربة والأتربة ثم يغسل الجزء المستعمل خاصة لو كان من أجزاء أرضية كالجذور والدرنات والريزومات تحت ماء جارى. وفى هذه الحالة يمكن تقشير هذه الأجزاء والتخلص من الأجزاء الخارجية الأكثر عرضة للتلوث. ويلي ذلك غمر المستأصل النباتي فى كحول يتراوح تركيزه بين ٧٠ و ٩٠% على أساس نوع النسيج وذلك لعدة ثوان، يعتبر الإيثانول من أكثر الكحولات استعمالاً لتعقيم الأنسجة النباتية سطحياً لكن من النادر استعماله بمفرده حيث يتم معاملة الأنسجة بعد غمرها فى الكحول بأحد المحاليل المطهرة. ويعمل الكحول بجانب قتله للميكروبات على إزالة الفقاعات الهوائية من على الأنسجة النباتية خاصة فى حالة وجود شعيرات أو زغب (شكل رقم ٥-٢) يغطى السطح الخارجى وبالتالي يعيق بشدة وصول المحلول إلى كامل السطح، كما يضمن زيادة فاعلية المحلول المعقم. ويشير (Tynan, 1994) إلى أن مشكلة إكثار نباتات *Banksia coccinea* تكمن فى صعوبة التعقيم السطحي حيث أوضحت صور المجهر الإلكتروني وجود الشعيرات التى تغطى السطح وكثير من الأجسام الغريبة بين تلك الشعيرات. وكانت بعض المعاملات باستخدام المبيدات الفطرية قبل فصل المستأصل النباتي ونقع الأجزاء النباتية فى محلول Benlate لمدة ١٢ ساعة فعالة فى التغلب على هذه المشكلة. وعموماً يتراوح زمن معاملة النسيج بالكحول من ٣٠-١٢٠ ثانية على أساس نوع النسيج فالأنسجة الغضة لا تتطلب سوى ٣٠-٦٠ ثانية أما الأنسجة المتخشبة والبذور فيمكن معاملتها بالكحول حتى ٥ دقائق. ويجب ألا تزيد مدة المعاملة بالكحول عن عدة ثوانى خاصة فى الأنسجة الخضراء حتى

لا تموت، يراعى عدم استعمال كحول تركيزه ٩٠% لأنه يذيب الطبقة الشمعية الخارجية وينزع الماء من الأنسجة مما يؤدي إلى موتها، وقد يلاحظ تغير لون الكحول سريعاً نتيجة استخلاصه الكلوروفيل بمجرد إضافته. وبعد المعاملة بالكحول يتم معاملة النسيج بإحدى المواد المعقمة. ومن أكثر المواد استخداماً لهذا الغرض الصوديوم هيبوكلوريت، ونترات الفضة، وماء البروم، وفوق أكسيد الهيدروجين، وبرمنجانات البوتاسيوم (Ahloowalia et al., 2004). لكن من الناحية التطبيقية يتم المعاملة بإحدى الكيماويات الآتية:



شكل ٥-٢: الشعيرات التي توجد على سطح بعض الأوراق تعيق وصول محلول التعقيم إلى كامل النسيج (<http://www.youtube.com/watch?v=ZBcs0hvnXgI>).

١. الصوديوم هيبوكلوريت NaOCl

يعتبر الصوديوم هيبوكلوريت من أكثر المواد استعمالاً في التعقيم السطحي. ويتراوح التركيز المستعمل منه ٢-٢.٥% وزن/حجم على حسب نوع النسيج النباتي وزمن التعقيم. وتستخدم أغلب المعامل محلول التبييض المعروف بالكلوركس والمستخدم في غسيل الملابس لهذا الغرض. والتركيز المشار إليه في معظم أبحاث زراعة الأنسجة يتراوح بين ٥ و ٢٠% ، لكن يجب التأكد من فاعلية الكلوركس من حيث تركيز الكلور،

ويجب عدم استعمال العبوات بعد فتحها بفترة طويلة مع حفظها في الثلاجة حتى لا يتطاير الكلور. ويعمل كل من حامض هيبوكلورس HOCl و OCl⁻ وهي الشق الفعال في الكلوركس على قتل الميكروبات بالأكسدة ويعتبر الأول أكثر فاعلية من الثاني. ويفضل أن يكون الرقم الهيدروجيني لمحلول التعقيم ٦-٧. كما يمكن استعمال هيبوكلوريت الكالسيوم بتركيز ٣٥-١٠٠ جم/لتر، مع ترشيح المحلول قبل استعماله. كما يستعمل هيبوكلوريت الكالسيوم المحضر في صورة أقراص بإضافة قرص لكل ١٠٠ مل ماء. ويفضل استعمال هيبوكلوريت كالسيوم بدلاً من صوديوم هيبوكلوريت في حالة الأنسجة الحساسة للتعقيم لأنه أقل نفاذاً في الأنسجة.

٢. كلوريد الزئبقيك HgCl₂

ربطلق عليه محلول سليمانى وهو من المحاليل المعقمة لكنه شديد السمية للإنسان وشديد الضرر للأنسجة النباتية إذا زاد تركيزه عن اللازم. ولذا لا ينصح باستعماله إلا في حالة عدم صلاحية المحاليل المعقمة الأخرى. وفي حالة استخدامه لابد أن تغسل الأجزاء المعقمة مرات أكثر بالماء المقطر بالمقارنة مع المحاليل الأخرى حيث أن ترك أى آثار من هذه المحاليل قد يقتل النسيج.

ولزيادة كفاءة محلول التعقيم يفضل إضافة ٥-٧ نقاط من محلول Tween 20 لكل لتر منه، أو يستعمل بضع نقاط من الصابون السائل إن لم تتوفر المادة الناشرة المشار إليها لخفض التوتر السطحي للمحلول فيزيد التصاقه بالنسيج. كذلك يمكن إجراء التعقيم تحت تفريغ جزئى لضمان طرد فقاعات الهواء التى قد توجد مع الأنسجة المراد تعقيمها. لكن التفريغ الشديد ربما يعمل على دخول المحلول إلى داخل النسيج مما يؤدي إلى موته. ويجب تقليب المحلول والأنسجة باستمرار أثناء التعقيم لضمان التلامس التام. ولمنع دخول المحلول المعقم إلى داخل أوعيه الخشب، يغمس طرف الساق أو أعناق الأوراق على سبيل المثال فى شمع سائل قبل إجراء التعقيم مع ملاحظة إزالة هذا الجزء

عند الزراعة. ومن الضروري معاملة النسيج بالمحلول المعقم لفترة زمنية مناسبة فزيادتها تسبب ضرر للنسيج ويلاحظ ذلك بتغير لون النسيج إلى الأبيض أو البنى، لذا تقطع هذه الأجزاء عند الزراعة.

وكان لسمك الطبقة الشمعية والشعيرات على أسطح نباتات *Banksia coccinea* دوراً في صعوبة التعقيم السطحي، وللتغلب على ذلك قام Godfrey & Cross (2005) بوضع السيقان بعد فصل الأوراق في محلول تركيزه ٠.٠١ مولر من حامض الهيدروكلوريك وبضع قطرات من Tween 80 بحيث كان الرقم الهيدروجيني ٢.٤ مع الرج لمدة ثلاثة دقائق. وبعد ذلك تم التعقيم السطحي بالصوديوم هيبوكلوريت لمدة ١٠ دقائق ثم نقلت المُستأصلات إلى محلول معقم من حامض الستريك بتركيز ٢.٤ مليمول ورقم هيدروجيني ٢.٩ لمدة ٥ دقائق قبل الزراعة. وكان من شأن تلك المعاملات خفض معدل التلوث حيث قل عدد الشعيرات على السطح مع زيادة في نعومة السطح بإزالة الكثير من الزوائد الشمعية والأجسام الغريبة من سطح المُستأصلات.

ويجب أن يؤخذ في الاعتبار تركيز المادة المعقمة وارتباطه بزمان التعقيم حيث يزيد الزمن اللازم للتعقيم عند استعمال تركيز منخفض من المادة المعقمة إذا كان النسيج حساساً للمحلول. وجدير بالذكر أن التركيز العالي ولمدة قصيرة يكون أكثر كفاءة في التعقيم من المحلول المخفف ولمدة طويلة. ولإعطاء فكرة عن تباين زمن التعقيم باختلاف نوع المُستأصل النباتي يوضح (Pierik 1987) أن أنسب زمن للتعقيم باستعمال ١٠% صوديوم هيبوكلوريت هو ٤٥ دقيقة بالنسبة لأوراق نبات *Strelitiza regina*، أما أوراق *Anthurium andreanum* وبذور *Tulipa gesneriana* فتعقم لمدة ٣٠ دقيقة، والبراعم الزهرية لنباتات الفيرزيا لمدة ٢٠ دقيقة، والأوراق العصارية من *Hyacinthus* والأعناق الورقية لنبات *Gerbera* ١٥ دقيقة، ويقل الزمن إلى ٥ دقائق فقط لقمم أفرع نباتات *Nephrolepis*. ويوضح جدول (رقم ٥-١) مقارنة بين بعض مواد التعقيم السطحي المستعملة في زراعة الأنسجة.

جدول ١-٥: مقارنة بين بعض المواد المستخدمة فى التعقيم السطحي للأجزاء النباتية المنزرعة (Razdan, 2002).

مادة التعقيم	التركيز المستعمل	سهولة غسلها	زمن المعاملة دقيقة	درجة التأثير
صوديوم هيبوكلوريت .	١٤-١ %*	+++	٣٠-٥	شديد التأثير
كالسيوم هيبوكلوريت	١٠-٩ %*	+++	٣٠-٥	شديد التأثير
فوق أكسيد الهيدروجين	١٢-١٠ %	+++++	١٥-٥	مؤثر
ماء البروم	٢-١ %	+++	١٠-٢	شديد التأثير
نترات الفضة	١ %	+	٣٠-٥	مؤثر
كلوريد الزنبيق	١-٠.٠١ %	+	١٠-٢	شديد التأثير
المضادات الحيوية	٤.٥٠ ملجم/لتر	++	٦٠-٣٠	مؤثر

* غالباً يستعمل ٢٠ % حجم/حجم من المحلول التجارى

ومن الجدير بالذكر الإشارة إلى أن معظم التلوث الحادث فى مزارع الأنسجة يرجع إلى وجود أنواع من البكتريا التى لا تمثل مشكلة للنباتات العادية لكنها تنشط تحت ظروف الزراعة المعملية (Leifert & Cassells, 2001). وكما سبق الإشارة يلاحظ أن عملية التعقيم السطحي لا تزيل كل التلوث الحادث من الميكروبات المختلفة، لكن لا بد وأن يضمن التعقيم السطحي قتل الغالبية العظمى من الميكروبات السطحية. ويجب التأكد من خلو المزرعة من التلوث فى نهاية مرحلة التأسيس، لكن لسوء الحظ ليس هناك طريقة سهلة لمعرفة ما إذا كان النسيج ملوثاً أم لا قبل زراعته. لكن من الممكن تحديد التلوث فى فترة وجيزة لا تتجاوز عدة أيام بشق المستأصل النباتي طويلاً إن كان ساق أو جذر وزراعته فى عدد من البيئات المحتوية على مستخلص الخميرة أو البيتون والتي

تشجع نمو الميكروبات المختلفة مع التحضين على درجة حرارة مرتفعة نسبياً عن تلك الموصى بها في مزارع الأنسجة. ولما كانت النباتات الناتجة من الزراعة المعملية خالية نظرياً من الكائنات الحية الدقيقة فإنه يجب العمل على تنشيط العلاقة التكافلية بين بعض الأنواع النباتية والكائنات الدقيقة مثل *Mycorrhiza* و *Rhizobium* عند نقل النباتات إلى الحقل بتلقيح الجذور لضمان النمو الجيد بالحقل وسيوضح ذلك لاحقاً.

التلوث الداخلي للمستأصل النباتي

ليس للنباتات جهاز مناعي كالحيوانات يحميها من مهاجمة الميكروبات كما أن عملية التعقيم السطحي تقضى على التلوث الخارجى فقط، أما التلوث الذى ينشأ عن وجود البكتيريا داخل الأنسجة فى المسافات البينية بين الخلايا أو داخل الحزم الوعائية فلا يتأثر بهذه المعاملات. ويطلق على هذا النوع من البكتيريا *Endophytic* وربما يظل التلوث كامناً إلى أن يتم تقسيم المستأصل النباتي وملامسة الكائنات الدقيقة أو جراثيمها للبيئة. وغالباً يكون التلوث الداخلى راجعاً للبكتيريا العصوية التابعة لجنس *Bacillus* أو من بعض الفطريات الجهازية. ويؤدى وجود الكائنات الدقيقة فى المزرعة إلى موتها أو تثبيط النمو كما سجلت بعض التغيرات فى قدرة بعض الأنسجة على النمو والتكثف وتكوين أفرع جانبية. لكن فى بعض الحالات لا يسبب وجود بعض أنواع البكتيريا داخل النسيج أى مشكلة فى زراعة الأنسجة فبكتيريا *Pseudomonas* التى تلوث القمم النامية لنبات الباباظ لا تسبب أى ضرر عند زراعة هذه القمم. لكن بتكرار أخذ أجزاء نباتية منها وزراعتها لمدة ١٣ مزرعة يحدث بطء فى نمو المزرعة (Pious et al., 2007) وللتغلب على التلوث الداخلى تزرع القمم النامية دون باقى الأجزاء النباتية لأنها غالباً خالية من التلوث ثم يستخدم النمو الناتج بعدها فى الزراعة، أو يتم إضافة بعض المضادات الحيوية إلى بيئة النمو. ونظراً لتخصص المضادات الحيوية يفضل إضافة أكثر من مضاد حيوى واحد للتغلب على الصور المختلفة من التلوث الداخلى. ومن حسن الحظ أن التلوث

الداخلي ليس شائع في النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة ويمكن التغلب على بعضه بسهولة فالقمة النامية لنبات *Pelargonium* بطول ١مم وليس القمم النامية للأفرع الجانبية خالية من التلوث والذي يوجد غالباً في أسفل الساق ويتكرر أخذ القمة النامية من المزرعة لمدة دورتين يمكن الحصول على نموات خالية من التلوث.

استخدام المضادات الحيوية

يعتبر الموت الموضعي لأطراف أوراق نباتات *Limonium cordatum* الناتجة من مزارع الأنسجة من المشاكل الشائعة في الإكثار التجارى لهذا النبات والذي يتم باستعمال الأعناق الزهرية كمستأصل نباتي. وقد عزل (2005) Liu et al. عدة أجناس من البكتيريا مثل *Pasteurella multocida* و *Stenotrophomonas maltophilia* و *Alcaligenes sp* من الأعناق الزهرية لهذا النبات. واستطاع التخلص من هذه البكتيريا وبالتالي نمو النباتات طبيعياً في الحقل إما باستعمال نباتات خالية من الإصابة أو باستعمال بعض المضادات الحيوية مثل إضافة augmentin أو cefotaxime أو خليط منهما إلى البيئة المستعملة للإكثار. والمضادات الحيوية هي مواد طبيعية تخلق بواسطة الكائنات الدقيقة أو تصنع معملياً ولها القدرة على وقف أو تثبيط نمو ميكروبات أخرى. ونظرياً يمكن إزالة التلوث من مزارع الأنسجة بإضافة واحد أو أكثر من المضادات الحيوية حيث يبين (1998) Keskitalo et al. أن القضاء على التلوث الداخلي في المستأصلات النباتية لنبات *Tanacetum vulgare* يتطلب استعمال أكثر من مضاد حيوى واحد، لكن كان لاستعمال كلا من rifampicin و gentamicin حتى بتركيزات منخفضة تأثير واضح فى وقف نمو معظم أنواع التلوث التي عزلت من هذا النبات. بينما تثبط نمو الأنواع التابعة لعائلة Enterobacteriaceae باستعمال cefotaxime وعند استعماله مع gentamicin أمكن تثبيط جميع أنواع البكتيريا تقريباً. لكن يؤكد (1987) Pierik أن استعمال المضادات الحيوية لا يضمن تماماً القضاء على التلوث الداخلى فقد يظل كامناً

دون أن يلاحظ بالعين المجردة لمدة قد تصل إلى عدة سنوات كما أشار Abreu-Tarazi (2009) *et al.* في مزرعة للأناناس. ثم ينشط النمو بعد فترة من الزراعة أو عقب نقل النباتات للحقل.

ويمكن بالطرق المعملية أو الجزيئية التحقق من وجود التلوث. فعلى سبيل المثال في حالة استعمال مركب carbenicillin للتخلص من بكتريا *Agrobacterium* التي تستعمل بهدف نقل الجينات إلى الخلايا في مزارع الأنسجة حيث لوحظ نشاط البكتريا بعد عدة مرات من إعادة الزراعة إن لم يضاف المضاد الحيوي للبيئة. لكن أشار Sedlak *et al.* (2008) إلى إمكانية التخلص من التلوث ببكتريا *Xanthomonas sp.* و *Bacillus sp.* لمستأصلات نباتات *Prunus avium* بإضافة ٢٠٠ ملجم/لتر من cefotaxime sodium لمزارع تكشف الأخطاء مرة واحدة. أما Thomas & Prakash (2004) فقد تمكنا من الحصول على ٧٥ % من أشطاء العنب التي تكشف من زراعة القمم النامية في أنابيب زراعة ١٥٠ X ٢٥ مم بإضافة ١ مل من محلول gentamycin أو cefazolin أو خليط منهما بتركيز ٥٠ ملجم/لتر فوق سطح البيئة.

لكن لا بد أن يؤخذ في الاعتبار أن إضافة المضادات الحيوية ليس بديلاً عن التعقيم السطحي والاحتياطات العامة للحد من التلوث. كذلك فإن لبعض المضادات الحيوية تأثير مثبط أو سام على نمو النباتات أو الكشف. فعلى سبيل المثال عند تجديد زراعة القمم النامية لنباتات *Pelargonium x hederacifolium* لعدة سنوات لاحظ Wojtania *et al.* (2005) حدوث تلوث ببكتريا *Paenibacillus glycanilyticus* و *Lactobacillus paracasei*. وللتغلب على هذا قام باستعمال عدة أنواع من المضادات الحيوية، فوجد أن استعمال كلا من neomycin و streptomycin سبباً سمية للنباتات. لكن أمكن تثبيط نمو البكتيريا بدرجة كبيرة مع تكوين أشطاء ذات جودة عالية بعد ثلاث مرات من نقل المزرعة إلى بيئة مضاف إليها carbenicillin بتركيز ٥٠٠ ملجم/لتر

لبيئة. وقد كان لاستعمال cefotaxime بتركيز ٢٥٠ ملجم/لتر تأثير مشابه لتثبيط نمو البكتيريا لكن سبب تقزم للسيقان واصفرار الأوراق وباستمرار الزراعة فى تلك البيئة ماتت النباتات. وتستعمل المضادات الحيوية بصور مختلفة كأن تضاف للبيئة أو يغمس فيها المستأصل النباتى قبل زراعته، أو رش النباتات الأم قبل أخذ الأنسجة لزراعتها، وأحسن نتائج للحد من التلوث عندما يغمر الجزء المنزرع فى المضاد الحيوى وزراعته فى بيئة تحتوى عليه. وقد حدد (Pierik 1987) الشروط التى يجب توفرها فى المضادات الحيوية المستعملة فى مزارع الأنسجة فيما يلى:

١. تذوب فى الماء.
٢. ثابتة وغير متأثرة بالرقم الهيدروجينى أو مكونات البيئة.
٣. ليس لها تأثير على مكونات البيئة أو المزرعة.
٤. لها مدى واسع من التأثير.
٥. قاتلة للميكروب وليست مثبطة لنموها.
٦. جهازية الحركة فى عصارة النبات.
٧. تضمن طريقة عملها عدم تطوير مناعة الميكروب ضدها.
٨. رخيصة الثمن.

لكن من الناحية التطبيقية يصعب إيجاد مركب يفى بكل هذه الشروط فمعظم المواد المستعملة تكون مثبطة للنمو. ويلاحظ أن معظم هذه المركبات تتكسر بالحرارة ومن ثم يجب تعقيمها بالترشيح خلال مرشحات قطر ثقبها ٠.٤٥ ميكرومتر والتى لا تسمح بمرور الميكروبات ويستقبل المحلول فى إناء معقم ثم يضاف للبيئة. ومن المضادات الحيوية المستخدمة فى زراعة الأنسجة carbenicillin و ampicillin و streptomycin و penicillin-G و chloromycine و cefatoxime و rifamycin ويعيق استعمال الكثير منها أثرها الضار على النمو والتكشف كذلك أثرها

على الإنسان. ويتباين أثر المضادات الحيوية على الأنسجة على حسب النوع النباتي والنسيج فقد لوحظ عدم نمو الأوراق الفلجية والقمم النامية لنبات *Brassica juncea* عند زراعتها في بيئة تحتوى على ٢٠ : ٥٠ ملليمول من Kanamycin بينما يمكن للبادرات النمو في بيئة تحتوى على تركيز يصل إلى ٢٠٠٠ ميكروجرام. ويرجع التأثير المثبط للمضادات الحيوية إلى تأثيرها على البلاستيدات والميتاكوندريا وتخليق الكلوروفيل (Weide et al., 1988). وقد يؤدي طول مدة زراعة الخلايا في بيئة محتوية على المضادات الحيوية إلى نمو خلايا مقاومة لهذا التركيز من المضادات الحيوية (Bhau & Wakhlu, 2001) إما عن طريق الطفرات أو بالانتخاب لتلك الجينات المتخصصة بالسيتوبلازم.

ويتباين تأثير المضادات الحيوية على مزارع الأنسجة والذي يتأثر بالطرز الوراثي للنبات. ففي نباتات *Tanacetum vulgare* على سبيل المثال وجد Keskitalo et al. (1998) أن سرعة تكشف الأشطاء زادت من ٨.٣ يوم إلى ١٩ و ٢٠.٥ و ٢٢.١ يوم عند استعمال gentamicin و rifampicin و cefotaxime على التوالي لوقف التلوث بالمزرعة، وقد زادت هذه المدة بزيادة التركيز. وقد انخفض عدد الأشطاء التي تكشف خطأ مع زيادة تركيز تلك المركبات الثلاث من ٧.٨ إلى ٢.٠، و ٢.٣، و ٢.٢ نبات/مستأصل على التوالي. وقد انخفض طول الأشطاء ومعدل النمو بشدة باستعمال منظمات النمو حيث انخفض معدل النمو من ٤٤.٨ إلى ٩.٥ باستعمال gentamicin. ولم تتكون الأجنة الجسدية في مزارع الباباظ عند استعمال Kanamycin بتركيز ٢٠-٢٠٠ ملجم/لتر أو geneticin بتركيز ١٢.٥-٥٠ ملجم/لتر (Yu et al., 2003). كما أثرت المضادات الحيوية المستعملة سلباً على تكوين ونمو الجذور.

لكن أشار البعض إلى تشجيع بعض أنواع المضادات الحيوية للنمو والتكشف في بعض أنواع الأنسجة المنزرعة. لكن لا تزال ميكانيكية هذا التنشيط غير معروفة بشكل

تام فقد وجد أن penicillens وكذلك carbenicillin يؤديان إلى تشجيع نمو خلايا *Bouvardia ternifolia* لأنهما يحتويان على سلسلة جانبية لها القدرة على تكوين مشتقات لبعض الأوكسينات بالتحلل المائي (Robert et al., 1989). ومن الأمثلة الأخرى للتأثير المنشط لبعض المضادات الحيوية في الأنسجة المنزرعة مركب bacitracin الذي أدى إلى تنشيط نمو الكالوس الناتج من نبات *Catharanthus roseus* وشجع استعمال timentin تكشف الأشطاء من الأوراق الفلقية لبعض أصناف الطماطم (Costa et al., 2000). كما أن الجرعات المناسبة من Kanamycin تنشط تكشف بروتوبلاست الدخان لكن التركيز العالي نسبياً يعمل على عدم تخليق الكلوروفيل في الأوراق. كذلك أدى Carbenicillin بتركيز ٦٠ ميكروجرام إلى زيادة عدد الكالوسات التي تكشف عنها أجنة من نبات الدخان. وقد شجع إضافة Cefatoxime بتركيز ١٠٠ ميكروجرام تكوين أجنة جسدية من الزيجوت غير الناضج للقمح. ولا بد أن يوضع في الاعتبار عند استخدام أحد المضادات الحيوية للتحكم في التلوث في مزارع الأنسجة التركيز اللازم لتنشيط التلوث والتأثير السام على النبات، فمثلاً المركب الذي يقتل البكتريا بتركيز ٥٠ ميكروجرام/لتر ويسبب سمية للنبات بتركيز ١٠٠ ميكروجرام يستعمل بأمان في زراعة أنسجة هذا النبات. لكن لا يستخدم هذا المركب إذا تساوى التركيز القاتل للبكتيريا مع التركيز السام للنبات.

كثيراً ما تسبب الفطريات الملوثة للأنسجة الداخلية مشكلة في مزارع الأنسجة. ورغم إشارة Shields et al. (1984) المبكرة إلى استعمال مضادات الفطريات mycotoxicity في مزارع الأنسجة إلا أن الأبحاث المنشورة في هذا المجال تؤكد أن استعمالها مازال محدوداً. ومن المركبات التي تستعمل لهذا الغرض المبيد الفطري Benomyl والذي يتكسر أثناء التعقيم، لكن المركب الناتج يكون له تأثير مثبط للفطر وقد يكون له تأثير مشابه للسيتوكينينات (West & Preece, 2006). ولكي تستعمل مضادات الفطريات في الإكثار الدقيق لا بد وأن تفي بنفس الشروط التي سبق

الإشارة إليها في الحديث عن المضادات الحيوية. ومعظم هذه الشروط يتوفر في مركبات ergosterol biosynthetic inhibitors (EBIs) شائعة الاستعمال في الزراعة والطب. ومن بين العديد من المركبات التابعة لهذه المجموعة يرى (Tynan et al., 1993) أن مركب miconazole جدير بالدراسة والاستعمال في الإكثار الدقيق نظراً لتأثيره الواسع على العديد من الفطريات وبعض أنواع البكتيريا الموجبة لصبغة جرام، وعدم تأثيره على العديد من النباتات في مزارع الأنسجة. وفي بعض الحالات ينصح برش النباتات في الحقل بأحد مضادات نمو الفطريات مثل Funguran بتركيز ١ جم/لتر (Prathanturarug et al., 2007)، أو غمر المستأصلات في محلول Benomyl بتركيز ٢ جم/لتر لمدة أربع ساعات ثم غسل المستأصلات بماء عدة مرات قبل التعقيم السطحي التقليدي -Mederos-Molina(2008).

وللتغلب على مشكلة التلوث بالبكتيريا والفطريات والتي وصلت إلى ١٠٠% في مرحلة تأسيس مزرعة نباتات *Guadua angustifolia* قام (Jimenez et al., 2006) برش النباتات في الحقل أو البيت المحمي أسبوعياً ولمدة ستة شهور أثناء موسم الأمطار وكل شهر من باقى شهور السنة بمحلول من Kilol L DF-100 بتركيز ٥ مل/لتر و Agri-mycin بتركيز ٢ جم/لتر أو Benomyl بنفس التركيز. كما استعمل المبيد الحشري Ambush 10 EC بتركيز ١ مل/لتر عند الضرورة. وقبل التعقيم تم غمر العقد الساقية في محلول قلووى ٠.٠٥ وزن/حجم من المبيد الفطرى Extran MA 01 لمدة ١٠ دقائق أو خليط منه مع Agri-mycin و Benomyl بتركيز ٢ جم/لتر لكل منهما لنفس الزمن. ثم تم التعقيم السطحي باستعمال الصوديوم هيبوكلوريت.

وتوضح النتائج المبينة في جدول رقم (٥-٢) نجاح هذه المعاملات في خفض معدل التلوث خاصة عند استعمال مستأصلات من البيت المحمي. أما إضافة ٢ جم/لتر من الخليط المعروف بـ Plant Preservative Mixture (PPM) وهو مركب تجارى

للتغلب على التلوث فى مزارع الأنسجة من إنتاج شركة Plant Cell Technology, Washington DC, USA فقد كانت ناجحة لخفض التلوث بشكل فعال. قارن Watt et al. (2003) بين إضافة الكالسيوم هيبوكلوريت أو ٠.٥-١ جم/لتر من Benomyl إلى بيئة الإكثار الدقيق للكافور فى مرحلة التأسيس فقط ولمدة أربع أسابيع. وتوضح النتائج المدونة فى جدول رقم (٥-٣) تأثير استعمال المبيد الفطرى أو الكالسيوم هيبوكلوريت فى خفض نسبة التلوث وزيادة نسبة تفتح البراعم وعدد الأفرع المتكشفة. لكن لاحظ Mohamed (2000) أن استعمال Benomyl بتركيز ٢ جم/لتر قد سبب ضرر كبير فى انبات بذور ونمو بادرات *Tagetes erecta*.

ثانياً: تعقيم غرفة النمو والأدوات والزجاجيات

لتفادى التلوث فى غرفتى الزراعة والنمو ينصح بغسيل الأرضيات والجدران بالمطهرات المنزلية المعروفة ثم مسحها بمحلول صوديوم هيبوكلوريت ٢% أو بالكلوركس كإجراء أسبوعى. كذلك تستعمل الأشعة فوق البنفسجية لتعقيم غرف الزراعة ليلاً وملاحظة أن هذه الأشعة ضارة للعينيين. وتعقم الأدوات المعدنية كالملاقط والمشارط قبل الاستعمال تعقيماً جافاً فى فرن التعقيم على ١٨٠°م لمدة ساعتين بعد لفها فى ورق ألومونيوم. ولتفادى انتقال التلوث من نسيج لآخر أثناء العمل يتم تكرار تعقيم الأدوات المستخدمة، ويتوقف ضرورة تكرار ذلك على مدى التلوث الملحوظ فى التجارب المماثلة وكفاءة القائم بالعمل. ويتم ذلك بغمرها فى كحول ثم وضعها فى اللهب وتترك حتى تبرد ثم تستخدم مباشرة. ويجب التنويه إلى أنه عند وضع المشروط فى اللهب لا يترك حتى يحمر لونه لأن ذلك يؤدى إلى فقدان حدته بسرعة محدثاً جروح أكثر بالنسيج علاوة على إعاقة العمل. ويجب استبدال الكحول من فترة لآخرى لأن تركيزه يقل باستمرار كذلك يجب مراعاة عدم تراكم الأجزاء النباتية والبيئة به.

جدول ٥-٢: تأثير المعاملة الأولى بالأبيدية بالعميديات القطرية والمضادات الحيوية وإضافة مركب PPM على معدل التلوث بعد ٨ أسابيع من تأسيس مزرعة *Guadua angustifolia* كما وجدها Jimenez et al. (2006).

مصدر المستخلصات	المعاملة الأولى	PPM* مل/لتر	التلوث %
الحقل	---	صفر	٩٤
	Extran	صفر	٨٨
	Benomyl + Agri-mycin + Extran	صفر	٧٦
	Benomyl + Agri-mycin + Extran	٠.٥	٦٧
	Benomyl + Agri-mycin + Extran	٢	٥٢
البيت المحمي	Benomyl + Agri-mycin + Extran	صفر	٥٨
	Benomyl + Agri-mycin + Extran	٠.٥	٦٣
	Benomyl + Agri-mycin + Extran	٢	٦١

* Plant Cell Technology, Washington DC, USA شركة إنتاج شرعية Plant Preservative Mixture

جدول ٣-٥: تأثير إضافة الكلوريت أو Benomyl إلى بيئة النمو على نسبة التلوث وتفتح البراعم وعدد الأفرع المتكشفة من نبات *Eucalyptus grandis* كما سجلها Watt et al. (2003).

المستخلصات	تأخير المعاملة (جم/لتر)	%	%	%	مرحلة تفتح البراعم		مرحلة الإكثار	
					التلوث	تفتح البراعم	عدد الأفرع/مستخلص	عدد الأفرع/مستخلص
أكياس بولي إيثيلين	مقارنة	١٠٠	-	-	-	-	-	-
	Benomyl	٢٠	٣١	٤٤	١١	٣.٥٤	١١	٣.٥٤
		٦.٧	٦٢	٢١	١٥	٦.٨٧	١٥	٦.٨٧
	CaOCl	١٣	٤٤	٣٨	١٦	٣.٧٧	١٦	٣.٧٧
		٢٠	٣٣	٢٢	٢٤	٤.٨٠	٢٤	٤.٨٠
مقارنة	٨٧	-	-	-	-	-	-	-
	Benomyl	٧٢	٢٠	١٠٠	-	-	-	-
		٣٢	٤٤	٣٣	١٣	٤.٥٥	١٣	٤.٥٥
	CaOCl	٠	١٧	٦٦	٢١	٤.٨٣	٢١	٤.٨٣
		١٠	١٧	٥٣	٢٠	٩.٢٠	٢٠	٩.٢٠

فيبرموكوبوليت
مقارن ومثل بالماء

وتوجد بعض الأجهزة الكهربائية الحديثة مثل Bacti-cinerator تستخدم في تعقيم الأدوات المعدنية أثناء العمل والتي تعتمد على وضع تلك الأدوات لمدة ٥ ثواني في كاس مملوء بكرات زجاجية ذات درجة حرارة عالية ٢٥٠م. ومن مميزات هذا الجهاز هو تقليل خطر الحريق ومنع أو تقليل تكوين غاز الإيثيلين الذي يؤثر على المزرعة. كذلك يجب مراعاة عدم ترك الأدوات المعدنية في كحول ٧٠% بعد الانتهاء من العمل حتى لا تصدأ.

ثالثاً: تعقيم البيئة

كما هو معروف تحتوى البيئة المستعملة في مزارع الأنسجة على العناصر الغذائية اللازمة للنمو بالإضافة إلى تركيز مرتفع من السكر، لذا فإنها وسط جيد لنمو الكثير من الكائنات الدقيقة. ومن ثم تعقم البيئة في الأوتوكلاف بعد تحضيرها مباشرة وقبل توزيعها في أوعية الزراعة أو تعقم كلها ثم توزع في الأوعية. وغالباً يتم التعقيم على درجة ١٢١م وضغط ١.٥ كجم/سم^٢ لمدة ١٥ دقيقة ومن الضروري أن يطرد الهواء من الأوتوكلاف عند بدء عملية التعقيم لأن الحرارة تنتقل في البخار أسرع من الهواء. ويختلف الوقت اللازم للوصول إلى درجة حرارة التعقيم باختلاف حجم البيئة ويوضح جدول رقم (٥-٤) الوقت اللازم لتعقيم أحجام مختلفة من البيئة.

جدول ٥-٤: الزمن اللازم لتعقيم أحجام مختلفة من البيئة على درجة ١٢١م (Pierik, 1987).

حجم البيئة (مل)								
٢٥	٥٠	١٠٠	٢٥٠	٥٠٠	١٠٠٠	٢٠٠٠	٣٠٠٠	٤٠٠٠
زمن التعقيم (دقيقة)								
٢٤	٢٦	٢٨.٥	٣١.٥	٣٥	٤٠	٤٨	٥٥	٦٣

ويلاحظ أن الحجم الأكبر من البيئة يتطلب زمن تعقيم أطول وذلك لطول الزمن اللازم للوصول إلى درجة الحرارة في وسط الوعاء المحتوي على البيئة إلى درجة الحرارة

المطلوبة. ويكون التلوث البكتيري والفطري واضحاً على سطح البيئة شبه الصلبة والأنسجة النباتية أو قد تظهر أعراض الإصابة بالكائنات الدقيقة فى شكل بقع لونها بنى على الأوراق أو السوق. أما فى حالة المزارع السائلة فإن التلوث يظهر على شكل عكارة إذا كان التلوث بكتيرى أما التلوث الفطرى فيتضح فى وجود كرات من الفطر. وقد تلوث البيئة والزجاجيات ببعض المواد الطيارة إذا كانت بعض الأدوات أو البيئة مغلقة بورق عادى كذلك فإن الأغذية البلاستيكية ينتج عنها غاز الإثيلين الذى يذوب فى البيئة وقد يثبط النمو.

تتكسر بعض المواد العضوية كالأحماض الأمينية، الفيتامينات، منظمات النمو، اليوريا جزئياً أو كلياً عند تعقيمها خاصة عند وجودها مع بعض المكونات الأخرى فى البيئة. وتزيد حساسية هذه المواد للحرارة بارتفاع درجة الحرارة وزيادة فترة التعقيم. ومن ثم يفضل تعقيم الأحجام الكبيرة من البيئة فى عبوات صغيرة حتى لا تضطر لإطالة فترة التعقيم. وفى معظم الحالات يمكن تعقيم المواد الحساسة جزئياً للحرارة مع باقى مكونات البيئة بشرط ألا تزيد مدة التعقيم عن ١٥-٢٠ دقيقة، أما المواد شديدة الحساسية للحرارة فإنها تعقم بالترشيح وتضاف للبيئة بعد التعقيم وقبل صبها فى أوعية الزراعة مباشرة. ويوضح جدول رقم (٥-٥) بعض مكونات البيئة ومدى حساسيتها للحرارة كما أوضحها (George (1993). فعلى سبيل المثال السكر وبعض السكريات الثنائية والثلاثية تتحلل مائياً عند تعقيمها فى وسط حامضى فيتحلل السكر إلى فركتوز وجلوكوز وعموماً ليس هناك تأثير ضار لهذا التحلل.

وقد تحدث عملية كرملة للسكريات وتتكون بعض الأحماض من السكريات الأحادية بفعل التعقيم، وبذلك ينخفض الرقم الهيدروجينى ولا يتصلب الآجار. وقد انخفض الرقم الهيدروجينى عند تعقيم بيئة MS المضاف إليها ٣٠ جم/لتر من الفركتوز أو المالتوز عند التعقيم لمدة ٢٠ دقيقة ودرجة حرارة ١٢١°م. وبخفض زمن التعقيم إلى

١٣ دقيقة وفتح جهاز التعقيم فور انخفاض الضغط إلى الضغط الجوى تصلب الأجار ولم يلاحظ تلوث فى المزرعة. وتزيد عمليات التحلل المائى، والكرملة، وتكوين الأحماض. عند تعقيم السكر مع باقى مكونات البيئة عن تعقيم السكر فى محلول مائى دون باقى مكونات البيئة وعموما ليس هناك ضرر كبير ينتج عند تعقيم السكر مع البيئة إلا إذا كانت جدول ٥-٥: تأثير حرارة التعقيم على بعض مكونات البيئة (George, 1993).

المركب	درجة التأثير بالحرارة
GA ₃ , IAA-L-alanine, IAA-glycine, IAA-phenylalanine, Pyridoxine, Riboflavine	ضعيف
ABA, Adenine sulphate, L-ascorbic acid, L-asparagine, Kinetin, 2-iP, 2-iP riboside, Zeatin	متوسط
Cystine, Benzyladenine riboside, Folic acid, Ca-pantothenate, L-glutamine,	عالي
Thiamine, L-tryptophan, Urea	عالي عند pH أعلى من ٥.٥
IAA	٤٠% (٢٠ دقيقة تعقيم)
IBA	٢٠% (٢٠ دقيقة تعقيم)
Fructose	مواد مثبطة للنمو

مدة التعقيم طويلة حيث تنتج بعض المواد المثبطة للنمو عند تعقيم الجلوكوز مع الفوسفات والأحماض الأمينية. والجلوكوز الذى يضاف إلى بعض البيئات أو الناتج من تحلل السكر يمكن أن يتكسر بالحرارة فى وجود الفوسفات والوسط الحامضى وينتج عنه أنواع أخرى من السكريات. وقد وجدت بعض الاستجابات المختلفة فى زراعة الأنسجة عند مقارنة تعقيم السكر مع البيئة أو إضافته بعد تعقيمه بالترشيح. ويتضح من جدول رقم (٥-٥) أن بعض منظمات النمو تتكسر أثناء التعقيم. ويمكن من الناحية العملية فى الإكثار الدقيق إهمال التغير الحادث لمعظم الأوكسينات والسيبتوكينينات أثناء التعقيم على الرغم من

ملاحظة تكسير جزء من IAA و IBA لكن يفضل تعقيم IAA و Kinetin و GA بالترشيح.

عزل وزراعة المُستأصل النباتي

يتم عزل ونقل المُستأصل النباتي إلى بيئة النمو بعد تعقيمه داخل كابينة الزراعة Laminar flow hood والتي يجب أن تعقم بالكحول قبل بدء العمل وتركها لمدة ١٥ دقيقة حتى نضمن أن الهواء الموجود في حيز العمل قد تغير بهواء معقم. وإن كانت الكابينة مزودة بلمبات UV فينصح بتركها مضاءة لمدة نصف ساعة قبل العمل في الكابينة لتعقيمها على ألا يستأنف العمل في الكابينة إلا بعد حوالي نصف ساعة. وبعد معاملة النسيج بالمحلول المعقم وغسله عدة مرات بالماء المقطر المعقم داخل كابينة التعقيم يتم وضعه على سطح معقم كطبق بترى ويفضل وضع ورقة ترشيح معقمة ومبللة بالماء في الطبق للمحافظة على رطوبة النسيج والشفرات المستعملة في تقسيم المُستأصل النباتي. وفي حالة الأنسجة الوعائية كالسوق يتم إزالة الجزء الطرفي الملامس لمحلول التعقيم والذي تغير لونه لأنها تموت غالباً، ثم يقطع المُستأصل النباتي ويتم ذلك باستعمال آلة حادة مثل المشروط الجراحي أو أجهزة ثقب خاصة ذات أقطار مختلفة حسب الحاجة.

وكما سبق القول يجب توخي الدقة في جعل الأجزاء المفصولة ذات أحجام متساوية بقدر الإمكان. وعند فصل القمم الميرستيمية يستعمل مجهر ذو قوة تكبير منخفضة للمساعدة في عملية الفصل. وبعد ذلك ينقل الجزء المفصول إلى وعاء الزراعة وتختلف طريقة وضع الجزء المنزرع، فالبيذور توضع على سطح البيئة لتوفير الأكسجين الضروري للإنبات كذلك الأمر للقمم الميرستيمية. أما الأجزاء كبيرة الحجم مثل العقل الساقية فيمكن وضعها أفقياً على سطح البيئة، أو غمس الجزء القاعدي منها في البيئة. في حين أن الأجزاء الرهيفة كأجزاء الأوراق يتم الضغط عليها برفق أثناء وضعها حتى يتم التلامس التام بينها وبين البيئة.

وتعتبر مهارة القائم بعملية صب البيئة في أواني الزراعة وإعداد ونقل الجزء المنزرع إلى المزرعة من العوامل الهامة جداً في الحد من التلوث. فالفنى الماهر قد يستطيع إجراء هذه العملية بدون حدوث تلوث نهائى أو حدوثه بنسبة منخفضة. ومن الضروري الأخذ فى الاعتبار بعض الاحتياطات العامة للحد من التلوث ومنها:

- غسل الأيدي بالماء والصابون جيداً قبل العمل ويمكن مسح الأيدي بالكحول مع ملاحظة أن الكحول يودى إلى جفاف الجلد.
- لبس قناع الوجه عند العمل.
- ملاحظة التلوث عند ما يمكن عن كابينية التعقيم وعدم إدخال الرأس داخلها بأى حال من الأحوال.
- المحافظة بغير اللبوس على الأيدي والساعدين غير ملامسين للكابينية.
- الاستدارة للظهر فى حالة العطس أو الكحة.
- يجب نفس الإمكان حمل أوعية الزراعة فى وضع أفقى أثناء نقل الأجزاء المزروعة إليها لتقليل التلوث.
- عدم وضع المزيد من الأدوات الأخرى وأواني الزراعة داخل الكابينية حتى لا تعوق حركة الهواء خاصة فى حالة الوحدات ذات الدفع الأفقى للهواء.
- توضع الأدوات بترتيب استعمالها حتى لا تضطر لتحريكها فوق بعضها البعض.
- عدم تمرير الأيدي أو أى أدوات فوق المزرعة إذا كانت الأوعية المحتوية عليها مفتوحة.
- الحرص الشديد بعدم ملامسة اليد لفوهة الوعاء أثناء نقل المزرعة من وعاء لآخر.

المشاكل الحشرية فى معمل زراعة الأنسجة

هناك أنواع مختلفة من مفصليات الأرجل مثل العناكب وبالتحديد التربس يمكن أن تلوث معمل زراعة الأنسجة حيث يمكنها حجمها الصغير من المرور إلى داخل الأوعية عبر الأغشية ومن ثم تتكاثر بسرعة كبيرة دون التنبه المبكر لوجودها، والذي يتضح بوجود التلوث على سطح البيئة. وكثيراً ما تتسرب هذه الحشرات إلى المعمل على ملابس العاملين به. ويشير (West & Preece 2006) أن كائن واحد من تلك الكائنات يمكنه نظرياً أن يتكاثر فى معمل زراعة الأنسجة وينتج نسل يقدر بحوالى ٢٥.٠٠٠ فرد

خلال شهر وأكثر من خمسة مليون فرد خلال شهرين. ويعتبر النمل صغير الحجم المعروف بـ *Monomorium pharaonis* والمنتشر في أغلب دول العالم أيضا من أكثر أنواع الحشرات المسببة لتلوث معامل مزارع الأنسجة. وبالرغم من أن الصراصير لا تدخل أوعية الزراعة إلا أن وجودها يعمل على إدخال ونشر ملوثات أخرى في المعمل. وقد يكون من الصعب التخلص من النمل والصراصير في بعض المعامل. ويمثل النمل والحشرات الأخرى مشكلة للمعامل طوال العام في المناطق الحارة أما في المناطق المعتدلة فإن المشكلة قد تنحصر في فصل الصيف. ويعتبر ترك المزارع القديمة في المعمل من العوامل المشجعة على وجود الحشرات حيث تعتبر النباتات والبيئة مصدر غذائي جيد لها.

وعلى العموم تعتبر الأكاروسات مصدر القلق الحقيقي في معامل زراعة الأنسجة حيث يمكنها حجمها الصغير (طولها أقل من 1مم) من الانتقال من مكان لآخر بالغبار أو على الحشرات أو الحيوانات الأخرى والإنسان. ومن ثم يجب إتباع قواعد صارمة لمنع تسربها للمعمل. ويتضح وجود تلوث بالحشرات أو العناكب في المزرعة بملاحظة التلوث الفطري الحادث على سطح بيئة الزراعة حيث يأخذ شكل خطوط تمثل مكان سير الحشرات الموجودة بالمزرعة. ودورة حياة هذه الكائنات في الظروف المعملية لزراعة الأنسجة قصيرة كما سبق الذكر لتوفر الرطوبة العالية في الأوعية، وينتقل بيضها أو الطور غير الكامل لها عند نقل وتجديد المزرعة. ويجب أن يعقم كل المعمل بمجرد اكتشاف التلوث وتعقيم المزارع الملوثة قبل التخلص منها وكذلك المزارع التي لا تكون هناك حتمية للإبقاء عليها. أما تلك التي لا يتضح بها التلوث وتمثل أهمية بالغة للمعمل فيجب تعقيمها من الخارج بالكحول ثم يعاد غلقها بالأفلام البلاستيكية (البارفليم). وقد يضاف أحد المبيدات الحشرية مثل Acephate بتركيز 10-100 ملليجرام/لتر من المستحضر التجارى المعروف باسم Orthene إلى بيئة النمو حيث يضاف إلى البيئة قبل التعقيم لأنه لا يتأثر بالتعقيم الحرارى (West & Preece, 2006). وكذلك استعمال أحد

المبيدات مثل Actellic فى دهان الجدران والأسقف. وقد استعمل أيضا مركب Fenbutan-oxid والموجود فى مستحضر تجارى يعرف بـ Vendex لدهان الأرفف كل ٦ أشهر للتغلب على وجود تلك الحشرات بالمعمل.

يعتبر التربة من الحشرات صغيرة الحجم والتي توجد غالبا فى منطقة القمة النامية للنبات حيث تتغذى على العصارة النباتية وتضع بيضها داخل أنسجة النبات تحت طبقة البشرة. وتسبب تلوث المزارع بعد تأسيسها حيث يفقس البيض المصاحب للنسيج المنزوع. ومن ثم يجب التأكيد من أخذ الأجزاء النباتية من نباتات غير مصابة بالحشرات. أما الحشرات كبيرة الحجم مثل النمل والصراصير فيمكن التحكم فى غزوها للمعمل بإحكام غلق الأبواب والشبابيك ووضع بعض المبيدات الخاصة حول الجدران الخارجية للمعمل.

مرحلة الأقامة للظروف الطبيعية Acclimatization to natural environment

يعتبر نجاح عملية نقل النبيتات الناتجة تحت الظروف المعملية إلى الحقل والتي يطلق عليها الأقامة acclimatization أو adaptation المقياس النهائى لنجاح البرنامج المستعمل لزراعة الأنسجة وقياس جدوى استعماله على النطاق التجارى. حيث تتعرض النباتات إلى صدمة مفاجئة تسبب موت الكثير منها. وتلعب درجات الحرارة، الرطوبة النسبية، شدة الإضاءة، تركيز ثانى أكسيد الكربون وسرعة حركة الهواء فى غرفة النمو وبالتالي تأثيرها على المناخ الدقيق دورا كبيرا فى نجاح الأقامة. ويرجع فناء عدد كبير من النبيتات عند نقلها إلى الظروف الطبيعية إلى الاختلاف الشديد بين النبيتات الناتجة من زراعة الأنسجة وتلك النامية فى الظروف العادية من حيث التركيب التشريخى والشكل الظاهرى وما يترتب على ذلك من خلل فى الوظائف المختلفة للأعضاء النباتية. فمن المعروف أن ظروف النمو فى مزارع الأنسجة تضمن أقل معدل إجهاد وأفضل ظروف لتكوين ونمو النباتات من حيث ارتفاع الرطوبة النسبية، مع توفير الكربوهيدرات فى

صورة جاهزة. كذلك تلعب منظمات النمو المضافة للبيئة دوراً في التغييرات الظاهرية والوظيفية لهذه النباتات (Wetzstein & Sommer, 1982). والتي قد تكون غير دائمة التغذية تماماً heterotrophic أو على الأقل خليطه التغذية الضوئية photomexotrophic ويجب دفعها لتصبح ذاتية التغذية الضوئية photoautotrophic بتحويل وسط النمو. وهذا ما سيتم استعراضه في الجزء التالي، وللمزيد من التفصيل حول هذا الموضوع يمكن الرجوع إلى المقالات المرجعية (Hazarika, 2003 & 2006) و (Pospíšilová et al., 1999 & 2007).

من الضروري أن تحتوى البيئة على تركيز عالى من السكر والأملاح المعدنية لضمان التكشف والنمو. ومن الثابت الآن أن السكر المضاف للبيئة يؤثر على بعض عمليات الأيض الثانوية وبالتالي محتوى النباتات من المواد العضوية المختلفة. وقد يتبادر للذهن أن تلك الأوراق ربما تكون مكتنزة بالمواد الغذائية المختلفة التي امتصتها سابقاً من البيئة وبذلك تدعم النمو عند الأقلية. وبالفعل كان معدل النجاح فى أقلية نباتات *Potentilla fruticosa* و *Ficus lyrata* أعلى عند استعمال تركيز 2-4% من السكر وكذلك ارتفاع الوزن الرطب والجاف للنباتات، وانخفض معدل نجاح الأقلية ووزن النباتات عند استبعاد السكر من البيئة. وربما يكون للسكر أهمية فى زيادة النمو والتخزين أثناء الإكثار الدقيق فقد لاحظ (Dang & Donnelly, 1993) زيادة فى معدل تكوين الجذور وكثافة الشعيرات الجذرية لنباتات *Rubus* بخفض تركيز السكر وزيادة ثلثي أكسيد الكربون، لكن قد تتباين هذه الاستجابة حتى بين أصناف النوع الواحد (Singh & Shyamal, 2001). وعموماً يمكن القول أن خفض تركيز السكر يشجع من اعتماد النباتات على نفسها فى تخليق السكر وبعض منظمات النمو والفيتامينات الضرورية لنمو بعملية البناء الضوئى. وقد يلاحظ ارتباط موجب بين زيادة تركيز السكر والكتلة الحيوية ومعدل تكوين الكلوروفيل للعديد من النباتات المعملية خاصة عند زيادة شدة الإضاءة.

أشد حساسية للتثبيط الضوئي عند إضافة السكر للبيئة مما يشير إلى أن الارتباط بين إضافة السكر والتثبيط الضوئي يتوقف على التركيب الوراثي.

وهناك العديد من الأبحاث التي تؤكد زيادة معدل نمو النباتات الخضراء في مزارع الأنسجة برفع تركيز ثاني أكسيد الكربون وشدة الإضاءة. وعموماً كان لنظرية التأثير الإيجابي للسكر على نجاح الأقامة نصيب قليل من النجاح حيث يعتقد Hazarika (2003) أن الضرر الشديد الناتج عن فقد الماء من أنسجة الأوراق يفوق تأثيرها كمواد مخزنة في الأوراق. لكن يصعب زيادة شدة الإضاءة الضرورية للبناء الضوئي لتماثل تلك في البيوت المحمية نظراً لارتباط ذلك بحدوث التثبيط الضوئي لعملية البناء الضوئي. كذلك رفع درجة الحرارة يزيد التكاليف الخاصة بتبريد غرفة النمو. أضف إلى ذلك أن أغلب الأغذية المستعملة لا تسمح بتبادل الغازات بين غرفة النمو وجو المزرعة فيخفض تركيز ثاني أكسيد الكربون وبالتالي تنخفض كفاءة البناء الضوئي للنباتات بدرجة عالية فيلاحظ قصور في تطور العضيات الخاصة بذلك على الرغم من أن الشكل الظاهري للنباتات قد يبدو طبيعياً. وفقدت النباتات ثلاثية الكربون ذاتية التغذية الضوئية ما يقرب من ٥٠% من الكربون الذي تم تثبيته في عمليات البناء الضوئي نظراً لعملية التنفس الضوئي تحت الظروف الطبيعية من تركيز الأكسجين (٢١%) وتركيز ٣٤٥ ميكرومول/مول من ثاني أكسيد الكربون، وبخفض تركيز الأكسجين إلى ١% توقفت عملية التنفس الضوئي (Hazarika, 2003).

وأشار Tichá et al (1998) إلى تباين محتوى أوراق النباتات المعملية من صبغات البناء الضوئي بالمقارنة مع النباتات في البيت المحمي على أساس تركيز السكر وشدة الإضاءة فقد سجل Mohamed & Alsadon (2010b) انخفاض في تركيز كلوروفيل أ و ب وكذلك الكلوروفيل الكلي لنباتات البطاطس النامية في أوعية مغلقة وباستعمال بيئة تحتوي على ٣% سكر بالمقارنة من النباتات النامية في أوعية تظمن

مما يعنى أن فرضية التأثير السلبي للسكر على تخليق الكلوروفيل ليست مطلقة (Koch, 1996).

لكن يحدث تثبيط لعملية البناء الضوئى عند زيادة شدة الإضاءة وتكون النباتات حساسة لهذه العملية تحت ظروف الإجهاد المختلفة ومنها نقص معدل عملية البناء الضوئى، كما يسبب انخفاض معدل ثانى أكسيد الكربون فى مزارع الأنسجة تثبيط ضوئى لعملية البناء الضوئى. وقد سجل (Serret et al., 2000) ذلك فى مزارع *Gardenia jasminoides* باستعمال تركيز من السكر يتراوح بين ٠.٥ و ٣% وكثافة ضوئية ١٠٠-٣٠٠ ميكرومول/م^٢/ث وباستخدام أوعية تسمح بتبادل الغازات انخفاض معدل التثبيط، لكن حدث التثبيط أيضاً لنباتات الدخان فى أوعية بدون أغطية عند ورفع شدة الإضاءة إلى ٧٠٠ ميكرومول/م^٢/ث (Semorádová et al., 2002). وقد كان لزيادة ثانى أكسيد الكربون باستعمال أغطية تسمح بالتهوية دوراً فى التغلب على التثبيط الضوئى قبل وأثناء الأقامة.

وربما يكون للسكر فائدة فى منع التثبيط الضوئى وإصلاح بعض العطب فى آلية هذه العملية، وبالتالي تزيد كفاءة البناء الضوئى بإضافة السكر بشرط كفاية محتوى الأوراق من صبغات البناء الضوئى. فقد وجد أن نباتات *G. jasminoides* التى نمت فى بيئة تحتوى على ٣% سكر وشدة إضاءة مرتفعة أقل تأثراً بالتثبيط الضوئى عند الأقامة من تلك التى نمت فى وسط خالى من السكر وباستعمال شدة إضاءة منخفضة. وقد يرجع ذلك إلى تشجيع السكر للنمو الذى يعمل بدوره على تكوين خلايا جديدة لها قدرة أعلى على البناء الضوئى. ويوضح (Ticha et al., 1998) أن نمو النباتات فى حالة photomixotrophic يزيد من معدل النمو وكفاءة البناء الضوئى مقارنة مع استعمال وسط خالى من السكر. وقد لعب إضافة تركيز منخفض من السكر دوراً فى الحد من التأثير المثبط للكثافة الضوئية على البناء الضوئى، لكن كانت نباتات *G. jasminoides*

عملية تبادل الغازات وخفض الرطوبة النسبية وباستعمال تركيز ٢% من السكر. وبزراعة نباتات *Phalaenopsis* في بيئة تحتوى على ٣% سكر أو بدون السكر وتحت التركيز الطبيعي من ثانى أكسيد الكربون أو ١٠٠٠ ميكرومول/مول سجل Yoon et al. (2009) اختلافات في معدل النمو. وقد زاد محتوى الأوراق من كلورفيل أ و ب وكذلك النسبة بينهما والنسبة بين الكلورفيل والكاروتينات بينما لم يتأثر محتوى الأوراق من الكاروتينات قبل الأقامة أو بعدها عند إضافة السكر مع رفع تركيز ثانى أكسيد الكربون. وقد زاد معدل النتج في أوعية الزراعة بزيادة تركيز ثانى أكسيد الكربون سواء بإضافة السكر أو بدون إضافة السكر للبيئة. كذلك زاد محتوى النباتات من السكر والنشا قبل الأقامة وعقبها بزيادة تركيز ثانى أكسيد الكربون. ويشير ذلك إلى أن النباتات التى نمت في المعمل تحت تركيز عالى من الغاز كانت ذات كفاءة عالية في البناء الضوئى عند أقلمتها.

ولا يتوقف الأمر على صبغات البناء الضوئى إذ يلاحظ أيضاً نقص في معدل إنزيمات البناء الضوئى مثل (ribulose biphosphate carboxylase (RubPcase. فعلى الرغم من نظام النقل الألكترونى الفعال في النباتات المعملة فإن عملية البناء الضوئى لم تكن فعالة لنقص الكلوروفيل وإنزيم RubPcase ولم تنشط هذه العملية بالأوراق التى تطورت أثناء زراعة الأنسجة حتى بعد نقل النباتات للبيت المحصى. وقد ماتت تلك الأوراق عقب ذلك، لكن قد تمثل هذه الأوراق كما في الفراولة مخزن يمد الأوراق الحديثة بالكربون والنشا (Grout, 1988). ويعتقد أنه في بعض النباتات مثل *Dieffenbachia* قد يكون للأوراق التى تطورت في المعمل القدرة على البناء الضوئى عند الأقلمة.

انخفض معدل صافى عملية البناء الضوئى للعديد من النباتات في الأيام الأولى من أقلمة النباتات إلا أن هذا المعدل ارتفع عقب ذلك وقد ارتبط ذلك بتكوين الأوراق

الحديثة في البيت المحمي (Van Huylenbroeck *et al.*, 2000). وقد انخفض معدل البناء الضوئي خلال أربعة أسابيع من زراعة أشطاء Birch على الرغم من استعمال شدة إضاءة تتراوح بين ٢٠٠ و ١٢٠٠ ميكرومول/م²/ثانية، لكن كان للنباتات في البيت المحمي تحت نفس شدة الإضاءة القدرة على البناء الضوئي (Smith *et al.*, 1986) لكن في دراسة موسعة لعدة أنواع من نباتات الزينة سجل Kozai *et al.* (1987) انخفاض حاد في تركيز ثاني أكسيد الكربون داخل أوعية الزراعة تراوح من ٣٠٠٠-٩٠٠٠ جزء في المليون أثناء الظلام إلى أقل من ٩٠ جزء في المليون أثناء فترة الإضاءة، مما يشير إلى قدرة النباتات على القيام بالبناء الضوئي. وقد يكون سبب بطء البناء الضوئي عقب ذلك نقص تركيز ثاني أكسيد الكربون. ومن ثم سجل صافي معدل عملية البناء الضوئي للعديد من النباتات المعملة مثل *Myrtus communis* زيادة برفع معدل تبادل الغازات في الأوعية (Lucchesini *et al.*, 2001).

وباستعراض العديد من الدراسات حول صافي معدل عملية البناء الضوئي للنباتات المعملة يرى Pospíšilová *et al.* (2007) أن انخفاض معدل صافي عملية البناء الضوئي في مزارع الإكثار الدقيق يرجع إلى نقص تركيز ثاني أكسيد الكربون في الأوعية محكمة الغلق على الأقل في النصف الأخير من فترة الإضاءة. وقد تأثر محتوى الأوعية من الغاز خلال اليوم الواحد على تركيز السكر بالبيئة. ويجب التأكيد على أن زيادة شدة الإضاءة دون رفع معدل ثاني أكسيد الكربون لا تزيد من كفاءة البناء الضوئي عند نقطة التعويض compensation point حيث تتساوى كمية غاز ثاني أكسيد الكربون الناتجة من التنفس مع التي تستهلك في البناء الضوئي.

إنتاج نباتات ذاتية التغذية الضوئية Photoautotrophic

كما سبقت الإشارة قد تنمو النباتات في مزارع الأنسجة بطريقة وسطية بين ذاتية التغذية الضوئية وغير ذاتية التغذية حيث تحصل على ثاني أكسيد الكربون من الوسط

الغازى والكربون العضوى المضاف فى صورة سكر من البيئة. وقد برزت أهمية تطوير تقنية الإكثار الدقيق لجعل النباتات ذاتية التغذية الضونية بهدف تقليل تكاليف الإنتاج واستعمال الميكنة فى الإكثار الدقيق بواسطة (Kozi & Iwanami, 1998) حيث تمكن هذه التقنية من استعمال أوعية كبيرة الحجم مع خفض معدل التلوث. ويكون للأوراق التى تكونت فى المعمل القدرة على الحياة والقيام بالبناء الضوئى عند الأقلمة.

وتعد تكاليف الإكثار الدقيق من معوقات استخدامه على نطاق واسع خاصة فى الدول النامية، ويمثل السكر والآجار المستعمل لتصلب البيئة حوالى ٨٠% من تكاليف البيئة. وقد أشار (Prakash et al., 2003) إلى أن تكاليف لتر واحد من بيئة MS المضاف إليها الآجار يصل إلى ٠.١٨ دولار أمريكى، وتنخفض القيمة إلى ٠.٠٨ فى حالة استبعاد الآجار. وإذا كانت المزرعة ذاتية التغذية ولا يتطلب الأمر إضافة السكر فإن التكاليف ستخفض إلى ٠.١٣ و ٠.٠٣ دولار للبيئة الصلبة والسائلة على التوالى. ولاستعمال السكر فى البيئة مشكلة أخرى حيث يجعل البيئة وسط ملائم لنمو الكائنات الحية الدقيقة. لكن يتطلب الأمر تشجيع الأنسجة النامية المحتوية على الكلوروبلاست من القيام بعملية البناء الضوئى ظروف خاصة. وأضاف (Kozai, 1991) أن النباتات النامية تحت تلك الظروف تمتاز بمجموع جذرى قوى وقدرة أفضل على الاتزان المائى ومقاومة الفطريات أثناء الأقلمة (Jeong et al., 1995).

فى نظام المزارع ذاتية التغذية الضونية والتى يطلق عليها PTCS- "Photoautotrophic Tissue Culture System" يجب توفير تركيز عالى من ثانى أكسيد الكربون بمعدل ١٠٠٠-١٥٠٠ ميكرومول/مول من الغلاف الغازى للمزرعة مع شدة إضاءة لا تقل عن ١٥٠ ميكرومول/م²ث وبذون إضافة السكر أو استعماله بتركيز منخفض (Kozai et al., 1997). ويمكن زيادة تركيز ثانى أكسيد الكربون فى الغلاف الغازى للمزرعة إما بدفع تيار منه إلى داخل أوعية الزراعة التى يفضل أن تكون كبيرة

الحجم أو برفع تركيزه في حجرة الزراعة مع استعمال أغطية تسمح بالتبادل الغازي (Kozai & Iwanami, 1988) وقد أمكن الحصول على معدل نمو لنباتات القرنفل والأراولا والبرميولا تحت هذه الظروف يعادل النمو باستعمال السكر. وتبين النتائج الموضحة في جدولي رقم (٦-٥) و (٧-٥) التأثير الإيجابي لزيادة تركيز غاز ثاني أكسيد الكربون على نمو النباتات، ويتضح أن زيادة الغاز قد تعوض نقص النمو الناتج عن عدم إضافة السكر.

جدول ٦-٥: نمو نبيتات *Chrysanthemum* بعد ٤ أسابيع من الزراعة في بيئة شبه صلبة محتوية على السكر أو خالية منه تحت تركيز متباين من ثاني أكسيد الكربون (Kozai & Iwanami, 1988)

صفة النمو		٢% حجم/حجم CO ₂		CO ₂ الجوى	
		٢% سكر	٠% سكر	٢% سكر	٠% سكر
طول الأفرع (سم)		٣.٥	٢.٧	٢.٨	٢.٣
عدد الأوراق		١٨.٠	١٤.٠	١١.٠	٩.٠
طول الأوراق (سم)		٠.٩	٠.٩	٠.٩	٠.٨
عرض الأوراق (سم)		٠.٨	٠.٧	٠.٧	٠.٦
عدد الأشطاء		٦.٠	٤.٠	٤.٠	١.٠
عدد الجذور		-	٥.٠	-	-
طول الجذور (سم)		-	١.٨	-	-
الوزن الطازج (ملجم)		٢٩٢	٢٥٦	٢٦٠	١٦٧
الوزن الجاف (ملجم)		٦٢	٣١	٢٨	١٢

جدول ٥-٧: تأثير تركيز السكر و ثاني أكسيد الكربون (حجم/حجم) على نمو نباتات الاراولا بعد ٤ أسابيع من الزراعة في بيئة سائلة (Mitra et al. 1998).

تركيز السكر						صفة النمو
٢%		١%		٠%		
تركيز CO ₂						
٢%	الجوى	٢%	الجوى	٢%	الجوى	
٢.٨	١٢	٥.٢	١١.٥	٢.٣	٢.٥	طول الأفرع (سم)
١٠	١٨	٧	١٢	٩	١٤	عدد الأوراق
٠.٣	١.٠	٠.٨	١.٤	٠.٣	٠.٣	طول السلاميات (سم)
٢	٣	١	١	٢	٤	عدد الأشطاء
-	٥	-	-	-	٥	عدد الجذور

وتعمل هذه الظروف على خفض الرطوبة النسبية في جو المزرعة والتي تلعب دوراً في ظاهرة التميؤ الزجاجي. وقد أمكن باستخدام هذه الأنواع من الأغشية وبدون زيادة في تركيز ثاني أكسيد الكربون زيادة معدل نمو ومحتوى الكلوروفيل لنباتات البطاطس (Mohamed & Alsadon, 2010b). وفي نباتات الدخان زاد محتوى أوراق النباتات ذاتية التغذية الضوئية من صبغات البناء الضوئي عند أقلمتها لكن حدث انخفاض فجائي في هذه الصبغات للنباتات خليطة التغذية الضوئية في الأسبوع الأول من الأقلمة عقبه زيادة في الأسبوع التالي (Kadlecek et al., 1998). زرع (Mitra et al., 1998) عقد ساقية بطول ١ سم من نباتات *Chrysanthemum* في بيئة MS سائلة أو شبه صلبة مضاف إليها ٠.١ ملجم/لتر IAA و ٠.٢ ملجم/لتر والسكر بتركيز صفر أو ٢٠ جم/لتر، وتم تدعيم النمو في البيئة السائلة باستعمال ورق الترشيح أو القطن. وتم رفع تركيز غاز

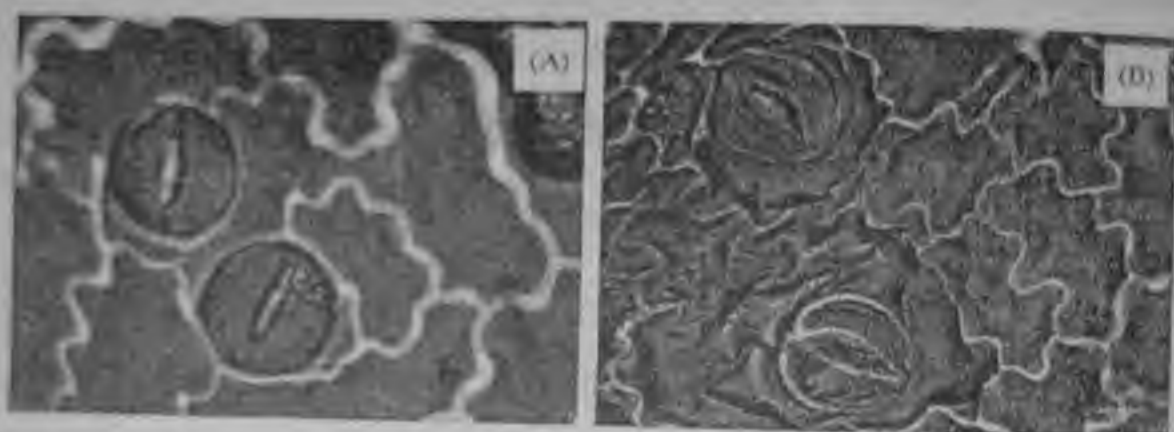
ثاني أكسيد الكربون ورطوبة نسبية ٦٢% وشدة إضاءة ٧٤ مليمول/م²/ثانية لمدة ١٦ ساعة يومياً لمدة ٣٠ يوم لرفع كفاءة الأقلمة. ويتضح التأثير الجوهري في ظروف النمو المشجعة لإنتاج نباتات خليطة التغذية الضوئية في:

١. تركيب الثغور

يعتبر الفقد السريع للماء من الثغور والأسطح الخارجية للنبات من أهم مشكلات الأقلمة حتى لو كان الجهد المائي لمحلول التربة المستعملة في الأقلمة أعلى من الجهد المائي للبيئة. ففي العديد من النباتات فقدت الثغور الاستجابة للعوامل البيئية التي من شأنها غلق الثغور، ولعل الخلل الذي يصيب تركيب الثغور من حيث حجم الخلايا الحارسة وطول وقطر فتحة الثغر هو السبب وراء ذلك.

لكن يلعب الطرز الوراثي دوراً هاماً في كثافة الثغور وتركيبها التشريحي في النباتات المعملية فعلى سبيل المثال لم يكن هناك اختلاف في تركيب الثغر وآلية عمله للعديد من الأنواع النباتية منها الطماطم والبطاطس وغيرها، ومن ثم نجد أن معدل أقلمة تلك النباتات قد يصل إلى ١٠٠% حتى بدون التدقيق في علمية الأقلمة (Mohamed et al. 1999) باستخدام نباتات *Tagetes minuta*. وبالفحص المجهرى يتضح الفرق بين تركيب ثغور النباتات المعملية وتلك النامية في البيوت المحمية أو الحقل. وتأخذ الثغور الشكل الدائري أو الهلالى وليس البيضواوى أو الكلوى كما في النباتات في البيوت المحمية (شكل رقم ٥-٣). وبالنظر إلى معامل عدد الثغور وهو عبارة عن عدد الثغور منسوباً لعدد خلايا البشرة فقد يسجل ارتفاعاً في بعض الأنواع أو انخفاضاً في الأخرى بالمقارنة مع النباتات النامية في البيت المحمي، فقد انخفضت هذه النسبة في أوراق نخيل البلح المعملية بالمقارنة مع النباتات في البيوت المحمية، ولم ترتفع حتى بعد المعاملة بمركب PEG. وقد انخفضت كثافة الثغور عقب نقل النباتات للبيت المحمي. لكن لاحظ (Pospisilova et al., 1999) عدم تغيير عدد الثغور بالسطح العلوى والسفلى لأوراق

الدخان، لكن نظراً لسرعة نمو الأوراق عقب الأظلمة فقد زاد عدد الثغور للضعف. وتساعد خفض الرطوبة وتركيز السكر في بيئة الزراعة على خفض عدد الثغور والتي أخذت شكلاً بيضاوياً كذلك المميّزة للنباتات في البيت المحمي على العكس من النباتات التي نمت في أوعية زراعة عادية مع رفع نسبة السكر في البيئة (Mohamed & Alsadon, 2010b). وتشير هذه الدراسة وغيرها إلى انخفاض عدد الثغور للنباتات خلية التغذية الضوئية أو ذاتية التغذية الضوئية عقب النمو في البيت المحمي.



شكل ٣-٥: شكل الثغور في أوراق نباتات البطاطس (A) خلية التغذية الضوئية (B) وذاتية التغذية (Mohamed & Alsadon, 2010b).

٢. التركيب التشريحي للأوراق

تكونت طبقة الميزوفيل في أوراق الدخان المعملية من طبقة واحدة مفككة من الخلايا العمادية غير تامة التطور وثلاث طبقات أو طبقتين من الخلايا البرانشيمية الأسفنجية. وفي بعض النباتات مثل *Vaccinium corymbosum* كانت طبقة الميزوفيل مكونة من طبقة أو طبقتين من الخلايا الأسفنجية ذات الفجوات العصارية الكبيرة ومحتوى منخفض من السيتوبلازم مع خلل في تكوين أغشية الكلوروبلاست، وربما زادت المسافات البينية بين تلك الخلايا وهذا الاختلاف يسبب إعاقة في عملية التبادل الغازي (Pospíšilová et al., 1999). وقد أشار أيضاً إلى تطور طبقة من الخلايا العمادية في أوراق *Brassica oleracea* بعد ثلاثة أسابيع من الأظلمة، وبالتالي زاد سمك

الورقة عقب الأظلمة مع انخفاض المسافات البينية. وتوضح النتائج التي نحصل عليها (Serret & Trilla (2000) من الدراسة المورفولوجية والتشريحية لأوراق نباتات *Gardenia jasminoides* الناتجة من زراعة الأنسجة أن هذه الاختلافات تنكسر بتركيز السكر في البيئة بالإضافة إلى شدة الإضاءة المستعملة كما هو مبين في جدول رقم (٤). وقد أوضحت النتائج أن الخلايا الحارسة كان بها عدد أقل من الريبوسومات والميتاكوندريا والبلاستيدات الغنية بالنشا وعدد من الفجوات العصارية كما أوضحها (Serret & Trillas (2000) في الجدولين رقم (٨-٥) و (٩-٥). وبين (Mohamed & Alsadon, 2010b) أن خفض تركيز السكر إلى ٢% مع استخدام أوعية تسمح بالتهوية يشجع الحصول على تركيب تشريحي لأوراق البطاطس يشابه تلك النامية في البيت المحمي، مما يحسن من الأظلمة.

٣. طبقة الكيوتيكل

وهو عبارة عن الطبقة السطحية اللاخلوية لأنسجة النبات ويقم إقرارها بواسطة خلايا البشرة وتتركب من حشوه من الكيوتين متقمص بها الشمع لتغطي سطح النبات. والدور الأساسي لهذه الطبقة هو الحد من فقد الماء بالنتح من أسطح النبات والذي يتأثر معمله بسمك وتركيب هذه الطبقة. ويعتبر التركيب الفقير لهذه الطبقة وعدم اتصالها على سطح الأنسجة من أهم العوامل التي تسبب سرعة فقد الماء أثناء الأظلمة (Hazarika et al., 2002). وقد وجد انخفاض كبير في التركيب البلوري لطبقة الكيوتيكل للنباتات المعملة بالمقارنة مع تلك في البيت المحمي.

لكن هناك بعض الاستثناءات التي لم يلاحظ فيها فرق في تكوين الكيوتيكل بين النباتات المعملة وتلك في البيوت المحمية (Pospíšilová et al., 2007). ويخفض الرطوبة النسبية في أوعية الزراعة والتي تصل في الحالات العادية إلى ٩٨-١٠٠% حيث تلاحظ قطرات الماء على الأسطح الداخلية يزيد معدل تكوين الكيوتيكل وبالتالي الأظلمة. وهناك العديد من المعاملات التي تتبع للحد من ارتفاع الرطوبة داخل القوارير

والحد من فقد الماء بالنتح عند الأقلمة ومن هذه المعاملات التي أوردتها Hazarika (2003) فيما يلي:

جدول ٨-٥: تأثير تركيز السكر وشدة الإضاءة على بعض الصفات التشريحية لأوراق نبيات *Gardenia jasminoides* الناتجة من زراعة الأنسجة Serret & Trilla (2000).

الصفات		شدة الإضاءة ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-2}$ PPFD)			
		١٠٠		٥٠	
		تركيز السكر جم/لتر		تركيز السكر جم/لتر	
		٣٠	٥٠	٣٠	٥٠
Thickness (mm)	Epidermis	٢٣.٦٨	٢٤.١٥	٢٤.٠٩	٢٤.٧٩
	Mesophyll	٤٠.٣٤	٥١.٢٦	٤٩.٦٠	٨٤.٠١
	Total leaflet	٦٤.٠٣	٧٥.٤٠	٧٤.٦٠	٧٢.٨٠
Relative volume	Palisade parenchyma (P)	٢٦.٣٨	٢٥.٨٣	٢٢.٤٣	٢٠.٥٣
	Spongy parenchyma	٦٣.٢٥	٥٦.٤٠	٦١.٨٩	٦٣.٠٦
	Air space	١٠.٣٦	١٧.٦٩	١٥.٦٧	١٦.٤٠
	P/S	٠.٤٢	٠.٤٨	٠.٣٦	٠.٣٣
Relative volume (%)	Epidermis	٣٧.١٧	٣٢.١٦	٣٣.٥٧	٣٤.٠٧
	Palisade parenchyma	١٦.٦٠	١٧.٤٧	١٤.٨٨	١٣.٥٧
	Spongy	٦٩.٦٩	٣٨.٣٤	٤١.١٥	٤١.٦٣
	Air spaces	٦.٥٥	١١.٩٢	١٠.٤٠	١٠.٧٨
Cross-sectional area (mm^2):	Palisade ceil	٥٦.٩٤	٨٤.٦٣	٧٤.٤٠	١٠٨.٨٧
	Spongy cell	٨٤.١٥	٨٤.٨٥	٩٠.٧١	١٦٠.٨٧

جدول ٥-٩: تأثير تركيز السكر وشدة الإضاءة على بعض الصفات التشريحية لأوراق نباتات *Gardenia jasminoides* الناتجة من زراعة الأنسجة Serret & Trilla (2000).

الصفة	شدة الإضاءة (mmol m ² s ² PPFD)							
	١٠٠				٥٠			
	تركيز السكر جم/لتر							
	٥	١٠	٥	١٠	٥	١٠	٥	١٠
	الخلايا البرانشيمية				الخلايا الإسفنجية			
Chloroplasts	٢.٥	٣.٧	٥.٣	٣.٦	٢.٧	٤.٣	٥.١	٣.٢
Chloroplasts/ mm ² cell (x10 ²)	٤.٧	٤.٧	٧.٣	٣.٦	٣.٥	٥.٥	٥.٧	٢.٤
Starch grains/ chloroplast	١.٠	١.٦	١.٦	٠.٩	٥.٠	١.٤	٧.٠	٠.٧
Plastoglobules/ chloroplast	١٠.٢	٨.٨	٧.٩	٦.١	٦.٤	٥.١	٥.٧	٩.٦
Mitochondria/ cell	٣.٥	٢.٢	٣.٨	٦.٧	٢.٩	٣.١	٤.٢	٤.٤

أ. استخدام معوقات النمو: استخدمت معوقات النمو بنجاح في بعض الدراسات لزيادة معدل الأقلمة وذلك لتأثيرها على معدل فقد الماء من البادرات. وتعمل معوقات النمو غالباً على تقصير طول السلاميات وصغر حجم الأوراق وزيادة معدل اللون الأخضر في الأوراق، كذلك يزيد سمك الجذور عقب المعاملة بمعوقات النمو. وباستعراض العديد من الدراسات حول استخدام معوقات النمو في أقلمة النباتات يرى (Hazarika 2003) أن تلك المركبات يمكنها أن تقلل الضرر الراجع للذبول أثناء الأقلمة، وبدون تأثير سلبي على النمو. فمعاملة نباتات *Malus domestica* بمركب Paclobutrazol وهو من معوقات النمو التي تستخدم بنجاح

مع العديد من النباتات تثبط إنزيم kaurene oxidase وبالتالي منعت أكسدة ent-kaurene إلى حامض ent-kaurenoic ومن ثم وقف تخليق حامض الجبريليك. وقد أدت إضافة paclobutrazol بتركيز ٠.٥-٤ ملجم/لتر إلى بيئة تجذير Chrysanthemum إلى خفض في فتحات الثغور، وزيادة الطبقة الشمعية على الأوراق مع زيادة تركيز الكلورفيل بها، وتقصير الساق، وزيادة سمك الجذور وكان من شأن ذلك خفض معدل الذبول عند الأقلمة. وأمكن الحصول على نتائج مشابهة في العديد من النباتات منها عدة أنواع من الحمضيات و الورد. وبمعاملة شتلات التفاح بمركب paclobutrazol زاد تركيز الكربوهيدرات والكلورفيل والبروتينات الذائبة والعديد من العناصر المعدنية في أنسجة الأوراق وقل تركيز السكريات العديدة في الجذر الخلوية وفقد الماء. وصاحب ذلك زيادة في معدل تنفس الجذور وتراكم حامض الأبسيسك (Steffens *et al.*, 1985 & Wang *et al.*, 1987). لكن استجابة الشتلات العادية لمعوقات النمو أعلى من النباتات الناتجة من الإكثار الدقيق وذلك لقلة عدد الجذور والشعيرات الجذرية مما يقلل من معدل امتصاص تلك المركبات من وسط النمو.

ب . استخدام مضادات النتح: يشير (Hazarika (2003 إلى دور بعض مضادات النتح في أقلمة النباتات لكن كانت نتائج استعمالها متعارضة بين التأثير الإيجابي والسلبى الراجع إلى تأثيرها على عملية البناء الضوئى والسمية الضوئية. بينما كان لتغطية أوراق العديد من العشبيات ببعض المواد كالجلسرول وشمع البارافين والزيوت تأثير في خفض معدل النتح عند الأقلمة، لكن لم تجرب على مستوى النباتات الخشبية. وأمكن خفض معدل نتح أوراق cauliflower عند رشها بتركيز ١٠ ميكرومول من حامض الأبسيسك، لكن لم يلاحظ فرق كبير في معدل النتح للأوراق التي تكونت عقب الأقلمة وربما يتأثر فعل هذا الحامض بدرجات الحرارة. قفلت ٥٦% من ثغور بادرات التفاح في مزارع الأنسجة بعد ٤ ساعات

من المعاملة بالمانيترول. وبعد ساعة واحدة من المعاملة بمركب *folicote* ومن ثم زاد معدل الأقلمة مقارنة مع الأقلمة تحت رزاز من الماء.

ج. خفض الرطوبة النسبية : من الثابت تعرض النباتات التى تتطور فى قوارير ذات رطوبة نسبية منخفضة لمشاكل أقل عند أقلمتها حيث يكون التركيب التشريحي والوظيفي أقرب للحالة الطبيعية. ومن العوامل الفعالة فى تحسين التركيب التشريحي للأوراق هو خفض الرطوبة النسبية فى القوارير لتمثيل تلك فى غرفة النمو. وهناك العديد من المعاملات لتحقيق ذلك منها استعمال بعض المواد ذات الميل العالى لامتصاص الرطوبة وتغطية سطح البيئة بمواد زيتية لوقف البخر منها. لكن لاحظ (Wardle et al., 1983) موت الكثير من النباتات *chrysanthemum* وانخفاض معدل تكوين الجذور عند تغطية سطح البيئة بزيت *lanolin* أو استعمال السليكا جيل لخفض الرطوبة فى القوارير. وينصح البعض بفتح الأوعية تحت ظروف التعقيم لبعض الوقت الذى يزداد تدريجياً لعدة أيام قبيل الأقلمة. كما أن لتبريد قاعدة القوارير تأثير إيجابى فى خفض درجة حرارة البيئة وبالتالي الحد من تبخر الماء منها. وكما سبقت الإشارة فإن كثير من الدراسات تشير إلى الدور الفعال للأغطية التى تسمح بالتبادل الغازى وخروج الرطوبة فى نجاح الأقلمة. كما تشير إلى إمكانية خفض الرطوبة فى قوارير زراعة القرنفل والتى قدرها بـ ٨٥% بزيادة تركيز السكر أو الآجار وكذلك باستعمال بعض المركبات المؤثرة فى الضغط الأسموزى مثل البولى إيثيلين جليكول. وقد زاد معدل تكوين الأشطاء بإضافة تلك المواد (Leshem, 1983).

يتضح مما سبق ضرورة الاهتمام بعملية أقلمة النباتات عند نقلها خارج المعمل حتى يمكنها التأقلم مع التغيرات البيئة الجديدة. وبالرغم من اختلاف عملية الأقلمة بين

النباتات المختلفة فهناك بعض الاحتياطات العامة لرفع نسبة نجاح الأقلمة والتي يمكن حصرها فيما يلي:

١. تكوين على الأقل مبادئ الجذور فى بيئة سائلة قبل النقل مباشرة.
٢. خفض الرطوبة فى الأوعية المحتوية على النباتات باستخدام أغطية منفذه للبخار أو تبريد القاعدة. وقد تترك الأغطية مفتوحة جزئيا فى جو معقم وليكن كابينة الزراعة لخفض الرطوبة النسبية. لكن يعاب على كل هذه المعاملات جفاف البيئة مما يعيق سحب الجذور منها دون حدوث ضرر.
٣. يمكن الإقلال من معدل فقد الماء من النباتات بمعاملتها ببعض المواد مثل Paclobutrazol, ABA, IPA أو BAP. أو ترش ببعض المواد المقللة للنتح مثل Clear spray, DC200, Exhalt 4-10, Folicote, protec مثل Aquawittess
٤. إزالة البيئة العالقة حول الجذور لأنها وسط ملائم لنمو الكائنات الدقيقة. مع ملاحظة عدم إحداث ضرر بالجذور المتكونة بقدر الإمكان ويمكن إجراء ذلك تحت تيار بطى من الماء.
٥. إزالة بعض الأوراق المتكونة للحد من فقد الماء ودفع النباتات لتكوين أوراق جديدة للقيام بالبناء الضوئى.
٦. معاملة الأفرع ببعض الأوكسينات لتشجيع تكوين الجذور عقب النقل.
٧. تزرع النباتات فى تربة جيدة يتم نخلها حتى نضمن نعومتها أو تستعمل تربة صناعية مثل الفيرموكيوليت أو البيتموس ويفضل تعقيم التربة بالبخار أو أشعة جاما قبل النقل على أن توضع هذه التربة فى أصص مثقبة من أسفل.
٨. تعامل النباتات بالمبيدات الفطرية لمقاومة فطريات الذبول.
٩. تحتاج بعض النباتات خاصة الأبصال وبعض الأشجار والشجيرات إلى معاملة بالبرودة على درجة ٥ °م لمدة ٤-٨ أسابيع لكسر طور السكون.
١٠. النباتات التى تكون أجزاء أرضية تستعمل للتكاثر مثل البطاطس والداليا يفضل نقلها على هذه الصورة لتحسين نسبة نجاح الأقلمة.

١١. يفضل رفع نسبة ثاني أكسيد الكربون لو أمكن حيث يسرع ذلك من دفع النباتات للقيام بالبناء الضوئي وتحولها من نباتات غير ذاتية التغذية إلى ذاتية التغذية.
 ١٢. توضع الأصص فى وعاء أكبر مملوء بالماء وتغطى النباتات والوعاء المحتوى على الماء بغطاء بلاستيك ليضمن مستوى عالى من الرطوبة النسبية.
 ١٣. تقلل الكثافة الضوئية باستعمال قماش على الأقل فى الأيام الأولى من الأقامة على أن ترفع الكثافة الضوئية تدريجياً. حيث تسبب الزيادة المفاجئة فى شدة الإضاءة تثبيط ضوئى وربما يحدث تكسير للكلورفيل (Van Huylenbroeck *et al.*, 1995 & 2000)
 ١٤. رفع الغطاء البلاستيكي تدريجيا بعد عدة أيام وقد يتم ذلك بإحداث ثقوب يزداد عددها تدريجيا إلى أن يزال الغطاء كلياً.
 ١٥. بعد ذلك يتم نقل النباتات من الوعاء المحتوى على الماء وتزرع فى بيتموس أو تربة عادية.
- يتضح مما سبق أن جل المحاولات لرفع معدل أقلمة النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة كان فى تحويل الظروف البيئية فى القوارير وكذلك فى البيت المحمي. لكن فى السنوات الأخيرة أشارت الكثير من الدراسات إلى دور الفطريات التكافلية المعروفة بـ arbuscular mycorrhizal (AMF) فى زيادة معدل الأقلمة وتحسين نمو وتطور العديد من النباتات عقب الأقلمة التى تمت فى فترة أقل. وقد ذكر Kapoor *et al.* (2008) العشرات من النباتات ما بين أشجار وحوليات التى تم تلقيحها بـ AMF عند الأقلمة. وتضم AFM العديد من أنواع الفطريات Glomeromycota phylum التى توجد فى التربة وتكون علاقة تكافلية مع جذور ما يقرب من ٨٠% من النباتات أغلبها من مغطيات البذور. ويقوم الفطر بإرسال الهيفات إلى داخل الخلايا النباتية للحصول على الكربون بينما ينتشر باقى الفطر خارج النبات فى التربة لامتصاص الماء والعناصر المعدنية منها وتهدف هذه العلاقة إلى حصول الفطر على الكربون من النبات بينما يقوم

الفطر بمد النبات بالفسفور وبعض العناصر الأخرى كما أنها تزيد مع تحمل النبات لبعض عوامل الإجهاد الحيوى والبيئى وبذلك تحقق العديد من الفوائد سواء للنبات أو للبيئة. ونظرا للفروق الجوهرية بين الظروف البيئة فى القوارير والبيت المحمى وكذلك للتباين بين مواصفات النباتات الناتجة فى القوارير وتلك النامية فى البيت المحمى فإن تلقيح النباتات بهذه الفطريات عند بدء الأقامة أو قبل نقلها من القوارير يرفع معدل الأقامة Puthur *et al.* (1998) و Yano-Melo *et al.* (1999) ويزيد من قوة النمو بتنشيط نمو المجموع الجذرى وزيادة كفاءة البناء الضوئى وخفض معدل النتح وامتصاص الماء والعناصر من التربة (Azcon-Aguilar *et al.*, 1996) و (Jaizme-Vega *et al.*, 2003). وقد سجل Estrada-Luna *et al.* (2000) زيادة فى معدلات النمو وكفاءة عمل الثغور ومحتوى نبات *Psidium guajava* من الفوسفور والماغنسيوم والنحاس عند نجاح تلقيحها بفطريات AMF عند أقلمتها.

ويفضل التلقيح باستعمال هيفات الفطر وليس الجراثيم حيث يلاحظ اختراقها للجذور خلال فترة قصيرة قد تكون ساعات على العكس من الجراثيم التى قد تستغرق أسابيع لإحداث العلاقة. لكن هناك العديد من المشكلات التى تعيق عملية تلقيح النباتات أثناء نموها فى القوارير بهذه الفطريات ومنها التلوث عند إضافة اللقاح وطبيعة نمو العلاقة الإجبارية التطفل للفطر وكذلك لبعض الاختلافات الفسيولوجية أثناء نمو النبات فى القوارير (Rai, 2001). ومن ثم فإن أغلب الدراسات تعتمد على التلقيح بجراثيم الفطر عند نقل النباتات إلى البيت المحمى. وعلى الرغم من اعتبار العلاقة بين النبات و AMF غير متخصصة فإنها تتوقف على بعض العوامل الفسيولوجية والتركيبية للنبات والفطر التى تتباين بشدة مما يسبب عدم تكوين العلاقة بين الفطر والنبات. لكن يعيق التطبيق الواسع للتلقيح بهذه الفطريات صعوبة الإنتاج الكمى لللقاح.

وفي النهاية لا بد من توضيح أن نقل وتسويق النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة إلى مكان الزراعة المستديم أو إلى المستهلك يتطلب عناية خاصة، وقد يفقد الكثير من النباتات أثناء عملية التسويق خاصاً إذا لم يتم أقلمة النباتات لوقت كافى فى البيت المحمى بعد نقلها من المعمل تحت دافع تقليل التكاليف. ولذا ينصح فى الشركات التجارية تخصيص مكان مستقل لإجراء عملية التغليف والتسويق. وغالباً يتم أقلمة نباتات الموز الناتجة من مزارع الأنسجة فى أكياس بلاستيكية سوداء اللون ويساعد ذلك على نقلها للتربة بنجاح فى المكان المستديم. ويجب اختيار مواد تغليف تتناسب مع درجات الحرارة والرطوبة التى ستعرض لها النباتات أثناء عملية النقل. ولا شك أن ذلك يرتبط بنوعية النباتات فعلى سبيل المثال يمكن تغليف ٤٠٠٠٠ نبات *lily* فى طرد يزن ٢٢ كجم بينما لا يمكن تغليف سوى نصف هذا العدد من نباتات *Spathiphyllum* أو ١٠٠٠٠ فقط من نباتات *Syngonium* بينما ينخفض هذا العدد إلى ٧٠٠٠ نبات *Cordyline* ويرجع ذلك إلى اختلاف معدل التنفس فى تلك النباتات وبالتالي كمية الحرارة الناتجة منه (Ahloowalia &Prakash, 2004). إذا كانت النباتات ستنتقل فى المناطق الحارة فيفضل استعمال مواد خافضة للحرارة مثل الثلج والثلج الجاف.

الفصل السادس

الإكثار الدقيق وزراعة الأعضاء والأنسجة النباتية

تتكاثر النباتات جنسياً أى باستخدام الجنين الجنسى الناتج من عملية التلقيح والإخصاب، أو باستخدام أى جزء من النمو الخضرى من النبات فيما يعرف بالتكاثر الخضرى أو اللاجنسى. والنباتات الناتجة بالتكاثر الجنسى فى النباتات خلطيه التلقيح تكون غالباً متباينة فى تركيبها الوراثى وغير مشابهة للنبات الأم حيث أنها تجمع صفاتها الوراثية من الأبوين. لكن يمكن إنتاج نباتات متشابهة وراثياً عن طريق التربية الداخلية لهذه المجموعة كما أن أفراد الجيل الأول الناتجة من تهجين أبوين homozygous تكون متشابهة فيما بينها. أما النباتات الناتجة من التكاثر الخضرى التقليدى فتكون فى معظم الأحيان متشابهة فى صفاتها ومشابهة للنبات الأم لأنها ناتجة بالانقسام الميتوزى للخلايا أى بدون إنعزالات أو توافيق وراثية جديدة. ويطلق على مجموعة النباتات الناتجة بالإكثار الخضرى لنبات واحد السلالة الخضرية vegetative clone. وبالطبع من المفضل من الناحية الزراعية لاعتبارات عديدة أن تكون جميع النباتات فى الحقل متشابهة فى صفات نموها، وهذه الميزة لا تتوفر فى حالة الإكثار الجنسى للنباتات خلطية التلقيح. وعلى الرغم من ذلك فالتكاثر الجنسى له عدة مميزات كوسيلة للتكاثر منها:

١. ينتج عنه عدد كبير من النباتات وبالتالي انخفاض تكاليف الإنتاج.
٢. إمكانية حفظ البذور لمدة طويلة دون فقد لحيويتها.
٣. سهوله نقل وتوزيع البذور.
٤. أغلب الأمراض لا تنتقل عن طريق البذور.
٥. استخدامه فى التحسين الوراثى المستمر وإنتاج أصناف جديدة من النباتات بطرق التربية المختلفة لتحقيق رغبات المنتجين والمستهلكين.

لكن الكثير من النباتات الزهرية كأغلب المحاصيل البستانية وبعض المحاصيل الحقلية لا تعطى بذوراً على الإطلاق، أو تعطى كمية قليلة من البذور بعد فترة من النمو

قد تكون طويلة جداً. وربما تكون حيوية البذور منخفضة حتى بمجرد تكوينها أو تفقد هذه الحيوية بعد فترة وجيزة. وفي بعض الأحيان تكون البذور الحقيقية وسيلة غير مناسبة للإنتاج التجاري كما في البطاطس والفراولة. لذلك هناك ضرورة للإكثار الخضري للكثير من الحاصلات الزراعية. وتتعدد صور الإكثار الخضري التقليدي لكن تعتمد كلها على استخدام جزء كبير نسبياً من النبات الأم لتكوين نبات جديد. ويتوقف مدى الاعتماد على طريقة ما من طرق التكاثر الخضري لإكثار نوع معين من النباتات على إمكانية إكثاره بهذه الطريقة وتكاليف الإكثار وتحقيق الغرض من ذلك. فالبطاطس مثلاً يمكن إكثارها بطرق التكاثر الخضري التقليدية لكن لإنتاج نباتات خالية من الفيروس لابد من استخدام مزارع الأنسجة. ولقد لعبت طرق الإكثار الخضري باستخدام الدرنات، والكورمات، والأبصال، والعقل، والترقيد، والتقسيم، والتطعيم دوراً كبيراً في إكثار العديد من المحاصيل الهامة مثل التفاح، والموز، وقصب السكر، والبطاطس، والفراولة ومعظم نباتات الزينة. كذلك يعتبر الإكثار الخضري من الأهمية بمكان في مجال تربية النبات فحفظ الأصول الوراثية لبعض الآباء لا يتم إلا بالإكثار الخضري. والتكاثر الخضري مهم أيضاً للحصول على كمية كافية من البذور من بعض التراكيب الوراثية المرغوبة لتكوين سلالة Clone لحفظها في بنك الجينات.

بالإضافة إلى ذلك فإن إكثار بعض الطفرات النافعة التي لا تكون بذوراً كالبرتقال والجوافة عديم البذور، يتم بطريقة الإكثار الخضري. وتعتبر الطرق التقليدية للإكثار الخضري غير وافية لحاجة الإنتاج الزراعي من حيث البطء، والصعوبة، وارتفاع التكاليف ومن ثم كانت هناك حاجة ملحة لدراسة إمكانية إكثار النباتات معملياً للتغلب على العقبات المشار إليها. لكن تظل طرق التكاثر الخضري التقليدية الأساس الذي تمخض عنه الإكثار الدقيق. كما تعتبر زراعة الأنسجة مرحلة أساسية من مراحل استخدام التكنولوجيا الحيوية لتحسين الوراثي. لكن تتوقف إمكانية إكثار نبات ما في القوارير على التركيب الوراثي والعوامل البيئية التي ينمو فيها النبات بالإضافة إلى

العوامل البيئية أثناء إكثار النبات كما سبق توضيحه. وتتوقف الطريقة المستخدمة في إكثار نبات ما باستخدام زراعة الأنسجة على قدرته الوراثية على التكاثر بهذه الطريقة. فبعض النباتات يمكنها تكوين براعم عرضية على جذورها وبالتالي يمكن إكثارها في مزارع الأنسجة باستخدام الجذور على العكس من النباتات التي لا تمتلك هذه الخاصية. ويجب الإشارة إلى أنه بالرغم من أن زراعة الأنسجة تستخدم للتغلب على بعض مشاكل التكاثر الخضري إلا أن طبيعة التركيب الوراثي للنوع لها تأثير واضح فلا يمكن مثلا أن تدفع أشجار التفاح لتكون درنات. وبصورة عامة يمكن القول أن البرنامج الناجح في الإكثار المعملية لا بد أن يفي بالأغراض التالية:

١. الثبات الوراثي للنباتات الناتجة أي عدم حدوث طفرات.
٢. خلو النباتات الناتجة من الأمراض ويعتمد ذلك على استخدام مصادر خالية من الإصابة.
٣. أن تكون عملية نقل النباتات للحقل سهلة ونسبة نجاحها عالية.
٤. احتفاظ النباتات بقدرتها على التضاعف باستمرار إكثارها معمليا.
٥. سهوله البرنامج واقتصاديته.

الإكثار الدقيق

يعكس التباين الطبيعي في قدرة بعض النباتات على التكاثر الخضري القدرة المذهلة لهذه النباتات على التضاعف. وتعتبر طريقة التكاثر الخضري التي حباها الله سبحانه وتعالى كثيرا من النباتات الأساس العلمي للتكاثر الدقيق في مزارع الأنسجة. وربما يصبح الإكثار الدقيق منافسا للإكثار التقليدي على الأقل في بعض الحالات. فيشير (Rout et al., 2006) إلى الإكثار التجاري لـ ١٥٦ نوعا من نباتات الزينة وحدها، وتسيطر هولندا وكولومبيا وإيطاليا وإسرائيل على ٨٠% من هذا الإنتاج والنسبة الدقيقة موزعة على دول العالم الأخرى. ويؤكد أن مشكلة ارتفاع أحور الأيدي العاملة في الدول المتقدمة هي العائق أمام التطبيق الواسع لتلك التقنية. ومن ثم تقوم الشركات المتخصصة باستخدام الميكنة في العديد من المراحل كإعداد الأجزاء النباتية وتحضير البيئة وفصل

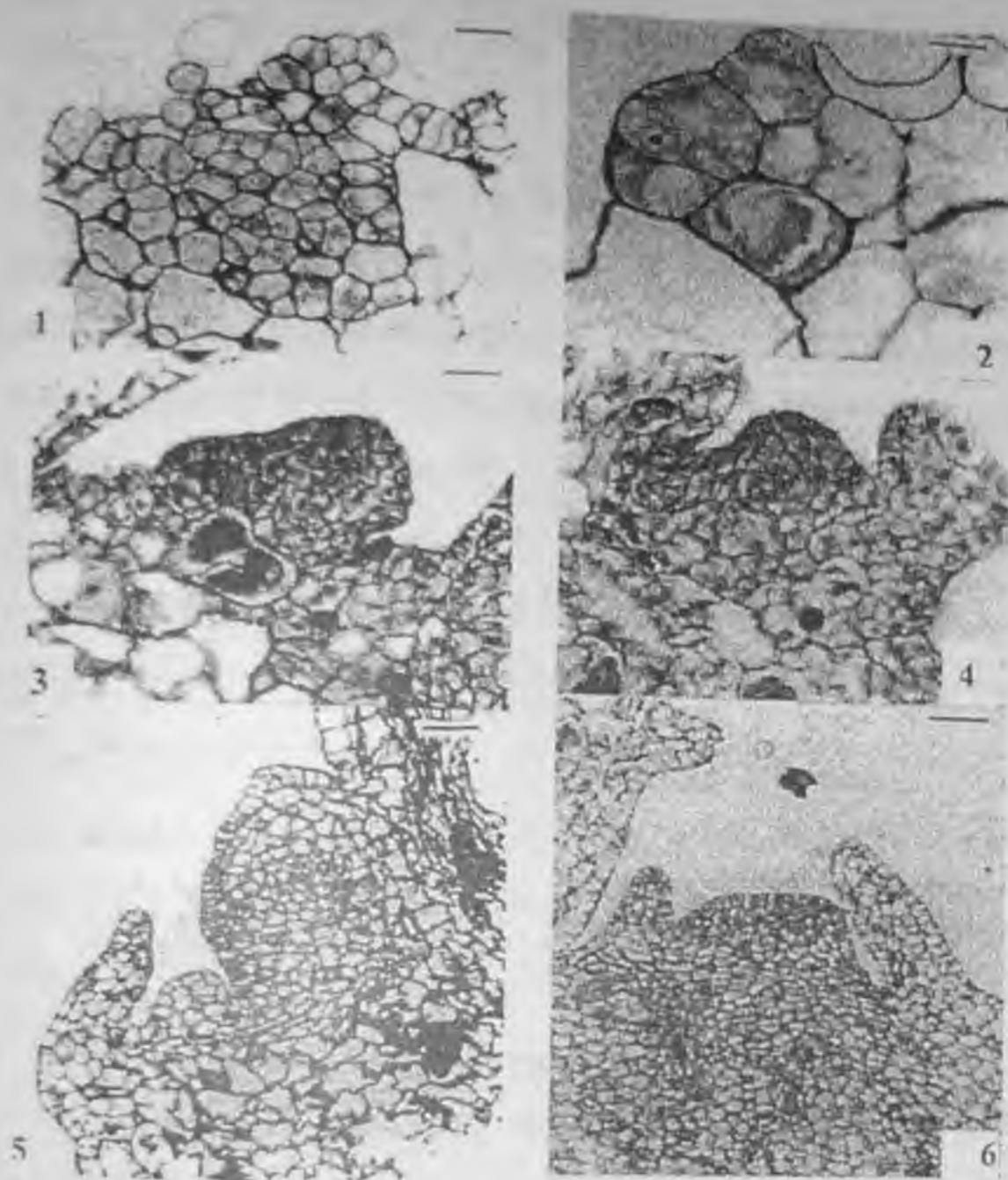
وتصنيف النباتات المتكشفة وإعدادها بطريقة تسهل من نقلها وزراعتها. ورغم صعوبة إكثار العديد من الأشجار الخشبية في مزارع الأنسجة بهذه التقنية فإن تقرير Dhawan (2005) & Saxena يشير إلى أن عدد الأشجار الخشبية التي تم زراعتها في الهند بلغ حوالي ٣.٧ مليون شتلة من أشجار *Anogeissus pendula* و *Eucalyptus spp* و *Populus deltoids* وغيرها في مساحة حوالي أربع الألف هكتار بعضها في مناطق ذات ظروف قاسية. وقد أمكن بتعديل بينات الزراعة التغلب على بعض المشكلات التي اكتشفت في الحقل في أشجار *Populus deltoides*.

يبدأ النمو الحديث الناتج من التكاثر الخضري باختلاف أنواعه من الأنسجة الميرستيمية والتي تقع في قمم السوق والجذور ومنطقة الكامبيوم في الساق وكذلك نسيج الكالس. وتتفاعل المحتوى الوراثي للنبات وبعض العوامل الطبيعية والكيميائية الأخرى التي سبق شرحها يمكن دفع هذه الأنسجة الميرستيمية لتتكشف إلى سوق، وأوراق، وجذور أو أجنة جسدية. ويمكن أيضاً تحت بعض الظروف دفع بعض أنواع الخلايا غير الميرستيمية - غالباً الخلايا البرانشيمية - إلى استعادة حالتها السابقة كخلايا ميرستيمية والتي تمتاز بصغر حجمها وكبر حجم النواة وكثافة السيتوبلازم والقدرة على الانقسام وتكوين أنسجة جديدة مختلفة. ويوضح شكل رقم (٦-١) تحويل خلية برانشيمية من كالس نبات *Curcuma zedoaria* إلى برعم يتكشف لاحقاً إلى ساق (Marcia et al., 2001). وتسمى الجذور المتكونة على السوق أو الأوراق أو السوق الناتجة من الجذور أو الأوراق بالعرضية حيث أنها تكونت في غير مكانها الطبيعي. والخلايا التي تترت من حالة التكشف إلى عدم التكشف يمكنها تكوين الكالس والذي يعرف بكونه كتلة من الخلايا غير المتكشفة أو الخلايا البرانشيمية التي تتكون نتيجة لإحداث جرح والتي يلاحظ تكونها في قواعد العقل وفي منطقه اتحاد الأصل بالطعم. وقد تتكشف الخلايا غير المتميزة في مزارع الأنسجة إلى جذور، سوق، أوراق أو أجنة جسدية. وتعتبر قدرة الخلية النباتية

على إعادة تكوين نبات جديد وهو ما يسمى totipotancy من الصفات التي حبها الله للخلايا النباتية دون الحيوانية.

وبصفة عامة تتضمن عملية إكثار النباتات باستخدام زراعة الأنسجة فصل خلية أو نسيج أو عضو نباتي ودفعه تحت ظروف مناسبة لتكوين أعضاء جديدة (Debergh & Read, 1991). ومن ثم توجد عدة أنواع من زراعة الأنسجة اعتماداً على نوع النسيج المستعمل في الزراعة كما سبق ذكره في الفصل الأول، لكن حديثاً استخدم (Hall (1999 و Neumann et al. (2009 مصطلح زراعة الخلايا cell culture لجميع صور الزراعة في القوارير. ويوضح شكل رقم (٦-٢) الطرق العامة لإكثار نباتات البطاطس باستعمال زراعة الأنسجة. لكن ما هي مميزات الإكثار المعملية؟. كما سبق القول يعتبر الإكثار المعملية تطوير لطرق الإكثار الخضرى المعروفة لذا فإن له نفس مميزات الإكثار الخضرى علاوة على ما يلى:

١. يتطلب الإكثار المعملية استخدام جزء صغير جداً من أنسجة النبات. ولسهولة التحكم فى عوامل النمو من عناصر غذائية، وهرمونات، وعوامل طبيعية فإن معدل الإكثار يكون سريع ويساعد هذا على سرعة إكثار السلالات والأصناف الجديدة.
٢. تتم عملية الإكثار تحت ظروف معقمة وباستخدام نباتات خالية من الأمراض والمسببات المرضية لذا فإن النباتات الناتجة تكون خالية من الأمراض فى أغلب الحالات.
٣. تستخدم بنجاح لإنتاج نباتات خالية من الفيروس.
٤. إمكانية إنتاج بعض النباتات التى يصعب إكثارها بالطرق العادية سواء الجنسية أو الخضرية أو لكون هذه النباتات بطئيه النمو.
٥. تمتاز بعض النباتات الناتجة ببعض الصفات المرغوبة كزيادة التفريع فى الفراولة وبعض نباتات الزينة.
٦. إمكانية إنتاج النباتات على مدار العام وعدم التقيد بفصول السنة.

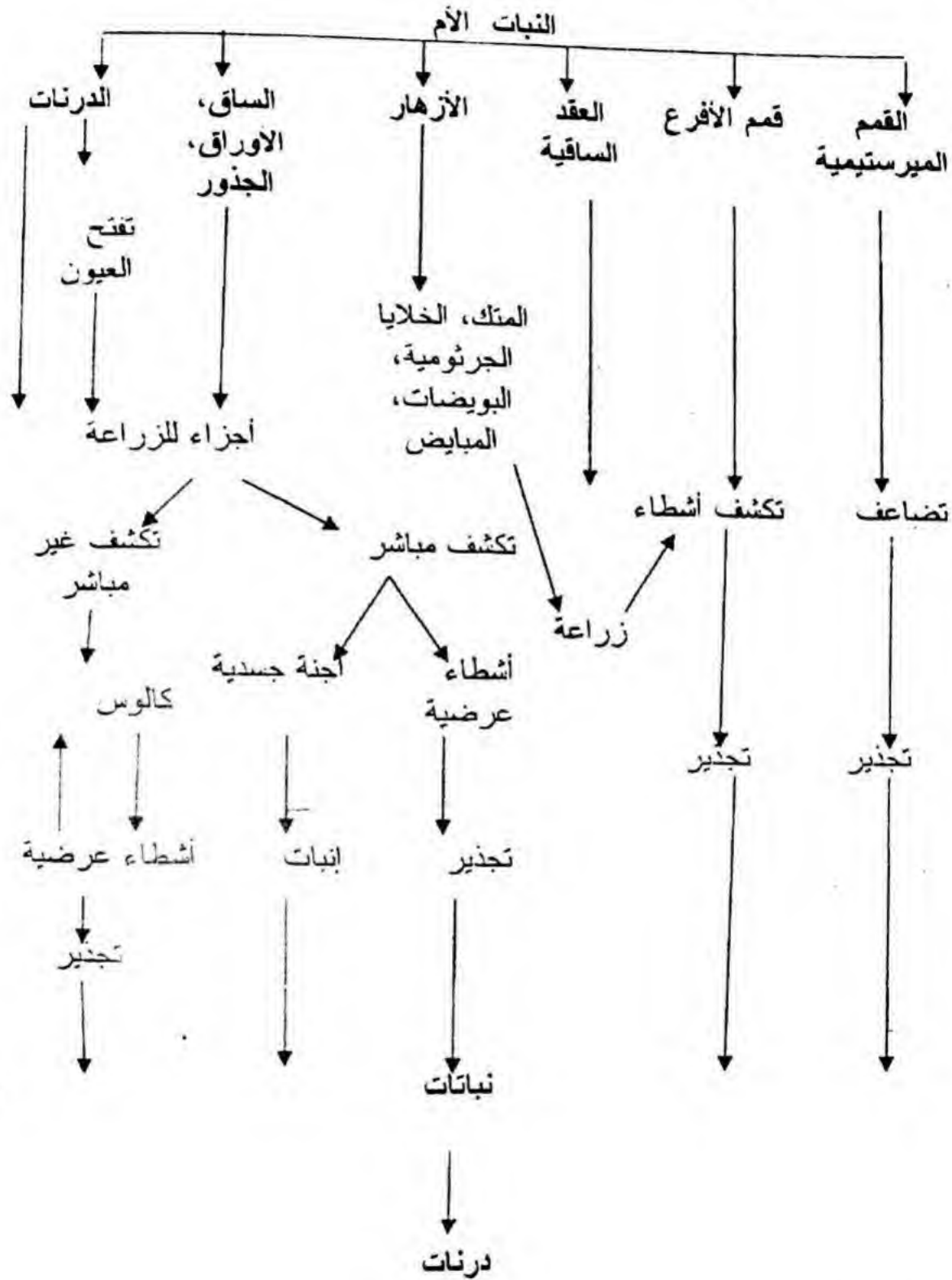


شكل ١-٦: قطاع طولى فى كالس نبات *Curcuma zedoaria* منزرع فى بيئة MS سائلة ومحفوظة فى الظلام. (١، ٢) يوضحان بدء تكوين المناطق الميرستيمية بعد ١٠ أيام من الزراعة (المستقيم الموضح يمثل طول ٥٠، ٢٦ ميكرومتر على التوالي). (٣) الخلايا الميرستيمية المتكونة وقد احتوت على سيتوبلازم كثيف بعد ٢٠ يوم من الزراعة (المستقيم الموضح يمثل طول ١٩ ميكرومتر). (٤، ٥) بداية تكوين برعم خصرى بعد ٣٠ يوم من الزراعة (المستقيم الموضح يمثل طول ٣٧، ١٠٠ ميكرومتر على التوالي) (٦) قمة الساق المتكونة ويتضح الاتصال الوعائى بينها وبين الكالس (Marcia et al., 2001).

٧. سهولة حفظ النباتات الناتجة لمدة طويلة، ونقلها من مكان لآخر بسهولة.
٨. صغر المساحة المستغلة.
- وعلى الرغم من هذه المميزات فإن من عيوب للإكثار باستعمال مزارع الأنسجة:
 ١. يحتاج إلى مهارات فنية عالية وأجهزة قد تكون مكلفة.
 ٢. اختلاف الطريقة المتبعة للحصول على أحسن نتائج باختلاف النباتات والظروف البيئية السائدة.
 ٣. صعوبة إكثار بعض النباتات خاصة الأنواع الشجرية وتباين القدرة على الإكثار الدقيق بين الأصناف التابعة لنفس النوع مع كثرة العوامل المؤثرة في ذلك.
 ٤. قد تتصف النباتات الناتجة ببعض الصفات غير المرغوبة مثل كثرة التفريع وهي غير مرغوبة في بعض النباتات. وقد لا تتكشف بعض هذه الصفات إلا بعد مدة طويلة كمرحلة الإزهار مثلاً.
 ٥. تواجه عملية أقلمة ونقل النباتات من المعمل إلى الصوبة بعض الصعوبات التي قد تؤدي إلى موت بعضها.
 ٦. احتمال إنتاج نباتات مختلفة وراثياً عن النبات الأم.
 ٧. تفقد بعض المزارع قدرتها على التكشف باستمرار زراعتها معملياً.

طرق الإكثار المعملی

يتم الإكثار المعملی بطريقة مباشرة من النسيج أو العضو النباتي أو بعد تكوين الكالس وتعرف الطريقة الأخيرة بغير المباشر. وتقسم طرق الإكثار المعملی إلى طريقتين أساسيتين هما (أ) نمو الأفرع من البراعم الطرفية أو الجانبية أي من البراعم سابقة التكوين على النبات الأم. (ب) تكوين الأفرع العرضية أو الأجنة الجسدية من أجزاء نباتية مختلفة. وتتم عملية التكشف غالباً في ثلاثة مراحل منفصلة اعتماداً على العوامل السابق ذكرها خاصة منظمات النمو والتي تؤثر على المزرعة. المرحلة الأولى



شكل ٦-٢: الطرق العامة لإكثار نباتات البطاطس بإستعمال زراعة الأنسجة (Jones 1991).

هى إعادة الخلية إلى مرحلة عدم التكشف لى تعاود الانقسام. والمرحلة الثانية هى تنشيط المحتوى الوراثى للخلايا المؤهلة للتكشف وتكوين العضو النباتى أما المرحلة الأخيرة فهى نمو الأعضاء المتكشفة. وقد قسم (Munetaka 1999) المرحلة الأولى إلى تحت مرحلتين الأولى هى اكتساب الخلية القدرة على الكشف إلى أشطاء أو جذور، والثانية حدوث الكشف. وبالفعل تم تحديد تلك المراحل معملياً بالطرق الفسيولوجية وبالفحص المظهرى لبعض الطفرات التى ينقصها القدرة على الكشف كتغيير اللون. وفى بعض النباتات أمكن تحديد جينات تلعب دوراً هاماً فى إعادة الكشف بالتحليل الوراثى وتم فعلاً عزل بعضها مما ساهم فى فهم بعض عمليات التطور فى النبات.

أولاً: إكثار النباتات عن طريق قمع الأفرع والبراعم الجانبية

تعتبر هذه الطريقة من أكثر الطرق شيوعاً لإنتاج نباتات مشابهة للنبات الأم وتعتمد هذه الطريقة على تنشيط البراعم الموجودة أصلاً على الجزء المفصول من القمم النامية أو من عقدة واحدة أو جزء من الساق مكون من عدة عقد. وعندما تنشط البراعم الجانبية وتصل لطول مناسب يتم استخدامها لإنتاج أفرع جديدة بتكرار تقسيمها وزراعتها مرة أخرى. وعندما تصل للعدد المناسب من الأفرع تدفع لتكوين جذور ثم تنقل إلى الصوبة. ويكون طول الجزء المنزرع فى حدود 1-2 سم من قمم الأفرع الجانبية أو الفرع الرئيسى، ويمكن استخدام جزء أطول حيث أنه يحمل عدد أكبر من البراعم ليزيد عدد النباتات المتكشفة. وللجزء الكبير قدرة أعلى على تحمل التعقيم السطحى وبذلك تزيد نسبة نجاح زراعته. بالإضافة إلى ذلك فإن نمو الجزء الكبير يكون أسرع من الجزء الصغير لكن يعاب على استعمال جزء نباتى كبير الحجم صعوبة تعقيمه. وقد أمكن بهذه الطريقة إكثار عدد كبير من نباتات الزينة والموز ونخيل البلح والعديد من المحاصيل المختلفة حيث يمكن مضاعفة أعداد النباتات مئات المرات فى مدة وجيزة وفى إحدى التقديرات النظرية لإكثار نبات الدخان أمكن الحصول على حوالى مليون نبات خلال ستة

أشهر باستخدام جزء نباتى واحد. ويتوقف معدل الإكثار على عدد البراعم الموجودة على الجزء المنزرع. وفيما يلي شرح لهذه الطرق.

١. زراعة القمم الميرستيمية وإنتاج نباتات خالية من الفيروس

وتصنف هذه الطريقة كطريقة مختلفة عن زراعة القمم النامية والعقد الساقية ذات البرعم الواحد أو عديدة البراعم، إلا أنها تعتمد أيضاً على وجود القمة الميرستيمية المتكونة أصلاً على النبات الأم. وكان من المعتقد أن التكاثر الجنسى يعتبر وسيلة لتفادى نقل الأمراض الفيروسية من الأم المصابة إلى النسل لكن أصبح من المؤكد الآن أن بعض الفيروسات تنتقل عن طريق البذور وبنسبة عالية جداً قد تصل إلى ٢٥% (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007). ويعنى ذلك أن التكاثر الجنسى لبعض النباتات ربما يساعد على انتشار الإصابة الفيروسية. وقد كان نجاح Morel (1960) مذهلاً حيث استطاع الحصول على عدة آلاف من نباتات الاوركيد المعروفة بصعوبة إكثارها فى سنة باستعمال قمة ميرستيمية واحدة. والآن يتم استخدام زراعة القمم الميرستيمية على نطاق تجارى وبجاح فى إنتاج الكثير من النباتات كالبطاطس (Jones, 1988)، والفراولة، والقرنفل، والموز والعديد من نباتات الزينة (Rout *et al.*, 2006) الخالية من الأمراض الفيروسية والفطرية والبكتيرية. ولهذا أهمية كبرى فى المحاصيل التى يعتمد إنتاجها على الإكثار الخضرى مثل الموز (شكل رقم ٦-٣)، اعتماداً على كون القمم الميرستيمية للنباتات المصابة خالية أو محتوية على أقل تركيز من الفيروس، وقد يرجع هذا إلى:

١. معدل انقسام الخلايا فى القمم الميرستيمية أعلى من معدل إصابته بالفيروس.
٢. النشاط الأيضى فى الخلايا الميرستيمية عالياً بدرجة تعيق دخول الفيروس إليها. وربما يعزى ذلك إلى إنتاج الخلية لبعض المواد التى من شأنها إعاقه العدوى.
٣. قد يثبط التركيز العالى من السيوكينينات فى الخلايا الميرستيمية نشاط الفيروس.



النباتات الناتجة من نمو المبرشتات



حجم مبرشتات ٥٠ ميكرومتر



المبرشتات بعد نقلها للبيئة الجديدة مباشرة



المبرشتات بعد شهر من نقلها للبيئة



نبات بعد أسبوع من الأتلة



نبات كامل جاهز للنقل والأقلمة

شكل ٦-٣: مراحل إكثار الموز الخالي من الأمراض عن طريق زراعة الأنسجة حتى مرحلة الزراعة في الأرض المستديرة بمركز الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية - كلية الزراعة - جامعة المنيا - مصر.

٤. عدم اكتمال نمو الأنسجة الوعائية في القمم الميرستيمية وبذلك يكون انتقال الفيروس خلال خيوط البلازموذوماتاً بطئاً.

وبصرف النظر عن سبب خلو الخلايا الميرستيمية من الإصابات الفيروسية فإن العلماء اتجهوا إلى دراسة إمكانية إنتاج نباتات خالية من الفيروس ببعض المعاملات التقليدية بمفردها أو بالدمج مع زراعة الأنسجة كزراعة القمم الميرستيمية أو البراعم الجانبية (Valero et al., 2003). وقد تمكن (Nascimento et al., 2003) من دمج عدة طرق مع زراعة الأنسجة للحصول على نباتات بطاطس خالية من الفيروسات. ومن هذه الطرق:

١. المعاملة الحرارية أو ببعض المركبات التي تعيق انقسام الفيروس.
٢. فصل زراعة القمم الميرستيمية.
٣. المعاملة الحرارية ثم فصل زراعة القمم الميرستيمية.
٤. تكشف الأفرع العرضية من نباتات مصابة متبوعاً بفصل زراعة القمم الميرستيمية.
٥. تعريض النبات الأم لفترة إظلام ثم فصل زراعة القمم الميرستيمية.
٦. الحصول على خلايا ميرستيمية من الكالس أو البروتوبلاست.

يلاحظ من العرض السابق مدى أهمية فصل زراعة القمم الميرستيمية في إنتاج نباتات خالية من الفيروس. ويتم ذلك بفصل أجزاء صغيرة جداً من القمم القمية الميرستيمية طولها عادة ٠.١ مم وقطرها حوالي ٠.٢٥ مم. ويتم الفصل تحت المجهر وبدقة متناهية لتجنب إحداث ضرر بالقمة. ويكون المستأصل النباتي على شكل حرف V بطول ٠.٣-٠.٥ مم بحيث تحتوى على منشآت الكامبيوم الذى يزيد من نسبة نجاحها. وكذلك يجب أن يتضمن المستأصل النباتي واحد أو اثنين من مبادئ تكوين الأوراق وهو ما يشير إلى الثبات الوراثي في النباتات الناتجة لأنها ستتكشف من أنسجة متكسفة على

النبات الأم وليس من براعم تكونت عقب ذلك. ويضيف (Grout 1999) ضرورة استبعاد أى أنسجة وعائية من المُستأصل النباتى لتفادى وجود الفيروس. ويبين Dale & Cheyne (1993) العلاقة بين حجم الميرستيم وعدد النباتات التى يمكن الحصول عليها ومدى خلوها من فيروس MCMV فى نباتات البرسيم الحجازى فى جدول رقم (٦-١). وتتخذ القمم الميرستيمية من النباتات متساقطة الأوراق عقب الخروج من دور السكون مباشرة، أما تلك المستديمة الخضرة فالوقت المناسب هو موسم النمو لعلاقة ذلك بنشاط الفيروس بالقمة الميرستيمية. يزرع المُستأصل فى وسط يشجع النمو وتكوين أفرع خالية من الإصابة. وبعدها يمكن إكثار الأفرع الناتجة بأى طريقة أخرى كمزارع القمم النامية أو العقد الساقية.

جدول ٦-١: العلاقة بين حجم الميرستيم القمى وعدد نباتات البرسيم الحجازى التى يمكن ألقمتها ومدى خلوها من فيروس MCMV كما وجدها (Dale & Cheyne 1993).

حجم المُستأصل مم	عدد المُستأصلات المنزرعة	عدد النباتات التى تم ألقمتها	عدد النباتات السليمة
أقل من ٠.٦	٩٠	١٨	١٨
٠.٦-١.٢	١١٣	٤٥	١٩
١.٣-١.٨	١٩٠	١٠٢	٢٥
١.٩-٢.٤	١٥٨	١٥٨	١١
٢.٥-٣.٠	١٧٤	١٧٤	١١

ولابد أن تتم عملية الفصل والزراعة بسرعة حتى لا تموت الأجزاء المنفصلة بسبب الهواء المتدفق من كابينة الزراعة أو حرارة الضوء المستعمل. ويفضل استعمال مجهر مزود بالضوء البارد أو استعمال الألياف الزجاجية لنقل الضوء لمسرح العمل (Bhojwani & Razdan, 1996). تنتقل الأفرع المتكشفة بعد ذلك إلى بيئة لتشجع نمو الجذور. وكان Morel & Martin أول من تمكنوا بنجاح من استخدام هذه الطريقة للحصول على نباتات Dahlia خالية من الفيروس فى سنة ١٩٥٢. لكن من الناحية التطبيقية يصعب فصل هذا الجزء الصغير جداً دون حدوث ضرر يمنع نموه. ورغم

سهولة الزراعة فى بيئة شبه صلبة إلا أن الزراعة فى بيئة سائلة مع تدعيم الجزء المنزوع فوق ورق ترشيح كركاب على شكل حرف m عادة ما يحسن من النمو. ويلاحظ أن فرصة تكوين الأفرع تزداد بزيادة حجم الجزء المنزوع لكنه قد يكون غير خالى من الفيروس، أما الأجزاء الصغيرة الحجم فغالبا ما تتجه إلى تكوين كالس أو جذور فقط. وغالبا يتكون الكالس من الخلايا المصابة أثناء العمل. ويجب عند ملاحظة تكوين الكالس التخلص منه فى أقرب فرصة لتفادى التغيرات الوراثية بسبب الكشف العرضى للبراعم. حيث يؤكد (Grouet 1999) وجود تباين فى المشابهات الإنزيمية بين النباتات الناتجة من الكالس وتلك المتكونة من القمم الميرستيمية مما قد يوحى بوجود اختلافات وراثية. وذلك على الرغم من عدم وجود اختلافات بين النباتات من حيث محتوى الخلايا من DNA واختلاف الطرز المظهرى للنباتات الناتجة من الكالس. ومن ثم فإنه يفضل فصل القمة بطول حوالى 1 مم وقطر 5 مم، وفى الغالب تنتج هذه القمة الميرستيمية نباتات خالية من الفيروس، مع ضرورة اختبار خلو النباتات الناتجة من الفيروس قبل إعادة إكثارها معمليا.

هناك صعوبة فى تعقيم النباتات المتوردة rosette والتي تمتاز بتقزم الساق فتبدو الأوراق وكأنها خارجة من منطقة واحدة تقريبا معطية شكل وردة وغالبا ما يحدث استطالة سريعة للساق عند الإزهار. ولكى نضمن الحصول على نباتات خالية من التلوث يفضل فصل القمم النامية وزراعتها فى بيئة غنية بالمواد المشجعة لنمو الكائنات الدقيقة مثل الببتون ومستخلص الخميرة لضمان عدم وجود تلوث داخلى. ويضاف إلى هذه البيئة بعض الهرمونات للعمل على استطالة الأفرع لتسهيل صل القمة الميرستيمية وزراعتها بعد ذلك. تكون بعض خلايا الكالس المتكون من الأنسجة المصابة بالفيروس غير مصابة وتتكشف عنها نباتات سليمة. إلا أن الميرستيمات المتكونة تكون غير مضمونة الخلو من الفيروس كتلك الناتجة من زراعة الأنسجة الميرستيمية، وتزيد نسبة الخلايا غير المصابة إذا أخذ الجزء المنزوع من القمم الميرستيمية، وربما يرجع ذلك إلى سرعة انقسام

الخلايا. ويمكن الرجوع إلى George (1993) و Grout (1999) للمزيد من المعلومات عن دور وكيفية استخدام زراعة القمم الميرستيمية للحصول على نباتات خالية من الفيروس.

٢. زراعة القمم النامية

يعتبر Robbins أول من استطاع فصل قمة ساقية من نباتات البسلة والذرة والقطن بطول ٣ مم تقريباً ونجح في زراعتها في المعمل وكان ذلك سنة ١٩٢٢. لكن لسوء الحظ وبسبب تحضين المزرعة في الظلام لتشجيع تكوين الجذور كانت الأفرع النامية صفراء ذات مجموع جذري كبير نسبياً لكنها ماتت بعد ذلك. ولم يحدث تقدم كبير خلال العشرين عاماً التالية لهذه المحاولة إلى أن استطاع White في سنة ١٩٣١ فصل وزراعة قمة ميرستيمية بطول ٠.١ مم من *Stellaria spp* ولاحظ تكوين بدايات الأوراق على الجزء المنزوع خلال ستة أسابيع من الزراعة. وكانت بداية نجاح استخدام هذه الطريقة كطريقة للإكثار الدقيق على يد العالم Loo في سنة ١٩٤٥ حيث زرعت القمم النامية بطول ١.٠-٥ مم لنباتات الأسبرجس في بيئة سائله مع تدعيم النمو على صوف زجاجي، وقد أوضح الملاحظات الآتية:

١. تتوقف سرعة النمو على تركيز السكر المضاف إلى البيئة.
٢. يمكن استخدام الأجار بتركيز ٠.٥% بدلاً من الصوف الزجاجي.
٣. أمكن استمرار نمو وتقسيم ونقل المزرعة إلى بيئة جديدة لمدة ٢٢ شهر.

لكن لسوء الحظ أيضاً لم يستطيع Loo تكوين جذور على الأفرع النامية. لكن في عام ١٩٤٦ نجح Ball في إنتاج نباتات من زراعة القمم النامية لنباتات *Lupinus polyphyllus* وأمكن نقل هذه النباتات إلى الحقل. وفي عام ١٩٦٣ تمكن Morel بنجاح من إكثار نباتات *Cymbidium* بزراعة القمم النامية في البيئة التي كانت تستعمل لزراعة البذور. وكان لأبحاث Murashige & Skoog الفضل في تطوير علم زراعة

الأنسجة عموماً وزراعة القمم النامية خاصة عندما توصلا إلى تركيب بيئة MS. كما ساهم اكتشاف السيٲوكينينات ودورها في كسر الميٲادة القمية في استخدام زراعة القمم النامية لإكثار بعض النباتات. ومن العوامل التي شجعت استخدام هذه الطريقة لإكثار إمكانية استعمالها مع عدد متباين من النباتات وبمعدل إكثار عالٍ، بالإضافة إلى إمكانية الحصول على نباتات خالية من الفطريات، وإنتاج نباتات مثالية للأم. لكن قد حسب استعمال السيٲوكينينات بهدف تكوين المزيد من البراعم العرضية استخدام بعض الطفرات الوراثية. فعلى سبيل المثال زرعت القمم النامية لنباتات الموز الحساسة للإصابة بفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* في بيئة تحتوي على السيٲوكينين. تم إعادة تقسيم زراعة النباتات الناتجة لسبع دورات للحصول على ٢٠.٠٠٠ نبات، تم تقييمها في الحقل انتخب منها ستة نباتات مقاومة للفطر بدرجة عالية لكن كانت ذات إنتاجية ضعيفة. وبإعادة إكثارها في القوارير أمكن انتخب ثلاث طرز مقاومة للفطر وذات إنتاجية مساوية للنباتات الأم (Bhojwani & Razdan, 1996).

طريقة زراعة القمم النامية

في معظم النباتات العشبية يمكن البدء باستخدام القمم النامية للساق الرئيسي أو الأفرع الجانبية على أن تتضمن المنطقة الميرستيمية وجزء من الساق يحتوي على بدايات الأوراق ويصل طولها إلى ٢ سم تقريباً. وفي بعض النباتات كالكافور يمكن أن يتضمن الجزء المنزرع برعم أو برعمين، وعموماً يفضل استعمال متاصلات ساقية كبيرة الحجم لأنها أسرع في النمو مع معدل بقاء أعلى وتكثف عدد أكبر من البتات لوجود عدد أكبر من البراعم العرضية ويطلق (George & Debergh, 2008) على المزرعة في هذه الحالة مزارع الأشطاء shoot culture. ويجب ألا يحدث خلط بين هذه الطريقة في حالة استخدام جزء يحتوي على براعم والطريقة الآلية هي زراعة العقد الساقية. ولما كانت البراعم المأخوذة من الأشجار تتأثر غالباً بفترة أخذها كان تكون في

طور سكون فإنه يجب اختيار الميعاد المناسب بحيث لا تكون البراعم في طور راحة أو ستدخله قريباً، وكما سبق يفضل دائماً أخذ البراعم والأشجار في مرحلة ما قبل البلوغ الجنسي. وإذا كانت البراعم المأخوذة من نباتات نامية في الحقل في طور سكون فإنه يمكن كسر هذا السكون في المعمل إما بالمعاملة بالحرارة المنخفضة من صفر إلى ١٢° م أو بزيادة فترة الإضاءة إلى ١٦ ساعة في اليوم مع خفض درجة الحرارة *Agora* (2003). وتُعطي القمم النامية المفصولة من البادرات النامية من بذور معقمة على بيئة مغذية نتائج أفضل. وعندما نحصل على كتلة من الأفرع في المعمل كما في الشكل رقم (٤-٦) كنتيجة لاستعمال تركيزات عالية من السيٲوكينينات يعاد تقسيم هذه الأفرع وزراعتها مرة أخرى في البيئة. ولا يفضل في هاتين المرحلتين الاقتصار على زراعة القمم النامية فقط بل يتم استخدام القمم النامية بالإضافة إلى البراعم الجانبية كما في الطريقة التالية.



شكل ٤-٦: القمم النامية الطرفية لنباتات القورفل المجبرة للزراعة إلى اليمين وإلى اليسار يتضح تكثف عدد كبير من الأشطاء نتيجة استعمال السيٲوكينين.

يختلف طول الأفرع المتكشفة في مزارع القمم النامية باختلاف الأنواع النباتية وتركيز منظمات النمو في البيئة فقد تكون الأفرع متقزمة للغاية ولا يمكن تقسيمها ولا تستطيل كما في القرنفل (شكل رقم ٦-٥) رغم استعمال تركيز ٢ ملجم/لتر فقط من BA. وعند الحصول على أفرع لها سلاميات واضحة فإنها تقسم إلى عقل صغيرة ثم تدفع إلى الاستطالة بتغير تركيز ونوع منظمات النمو. أما النباتات المتوردة حيث لا يستطيل ساقها يكون من الصعب فصل أفرع فردية من الأفرع المتكشفة فيتم تقسيم كتلة الأفرع المتجانسة إلى عدة أجزاء يحتوى كل جزء منها على عدد من الأفرع ويتم زراعتها من جديد. وتكون هذه الطريقة مثالية في حالة الرغبة في إنتاج نباتات كثيفة النمو الخضري كما في بعض نباتات الزينة. أو يتم دفع الأفرع إلى الاستطالة باستعمال بعض منظمات النمو مثل الجبريلين، بالإضافة إلى خفض الكثافة الضوئية أو الإظلام. وعندما نحصل على عدد كافى من الأفرع تنقل بعد ذلك إلى بيئة التجذير. وهذه البيئة لابد أن تكون خالية من السيتوكينينات التى تثبط تكوين الجذور، وقد يضاف لها بعض الأوكسينات أو يخفض تركيز الأملاح المعدنية في البيئة كاستعمال تركيز نصف أو ربع أملاح MS خاصة في حالة النباتات الخشبية. وتعتبر هذه الطريقة من أكثر الطرق التجارية إتباعاً في إكثار النباتات العشبية بصفة عامة والأشجار بصفة خاصة.

استخدمت هذه الطريقة بنجاح كبير في إكثار نباتات الأوركيد حيث لاحظ Moral في سنة ١٩٦٤ تكوين كالس من القمم النامية الموضوعة على بيئة شبه صلبة من الآجار وبعض الأملاح المعدنية وسكر الجلوكوز. ثم تكونت تراكيب صغيرة تشبه الكوريمات أطلق عليها مبادئ الكوريمات protocorm. وهذه التراكيب تشبه تلك التى تتكون في ظروف الإكثار العادية لنبات الأوركيد حيث يكون لها قطبين محددين لكنها غير خضراء اللون ولا تحتزن كربوهيدرات لأنها لا تقوم بالبناء الضوئى. وينقل هذه التراكيب إلى بيئة جديدة مختلفة التركيب تكشف نباتات كاملة. وتم تحسين معدل تكوين



شكل ٥-٦: الأقطاء المتقدمة لنباتات القرنفل بسبب استعمال تركيز عالي من السيٲوكينين فقط (في اليسار)، وعلى اليمين الأقطاء وقد استطالت عقب الزراعة في بيئة تحتوي على أحد الأوكسينات فقط.

هذه التراكيب بوضع القمم النامية في بيئة سائلة متحركة حيث تفتت ميرسٲيمات هذه التراكيب إلى أجزاء أصغر وكون كل منها تراكيب جديدة مماثلة. وينقل Neumann et al. (2009) أنه يمكن إنتاج مليون نبات *Cymbidium* بزراعة قمة واحدة في فترة تسعة أشهر فقط. وأمكن بعد ذلك إنتاج هذه التراكيب من زراعة الأنسجة الورقية لنبات الأوركيد.

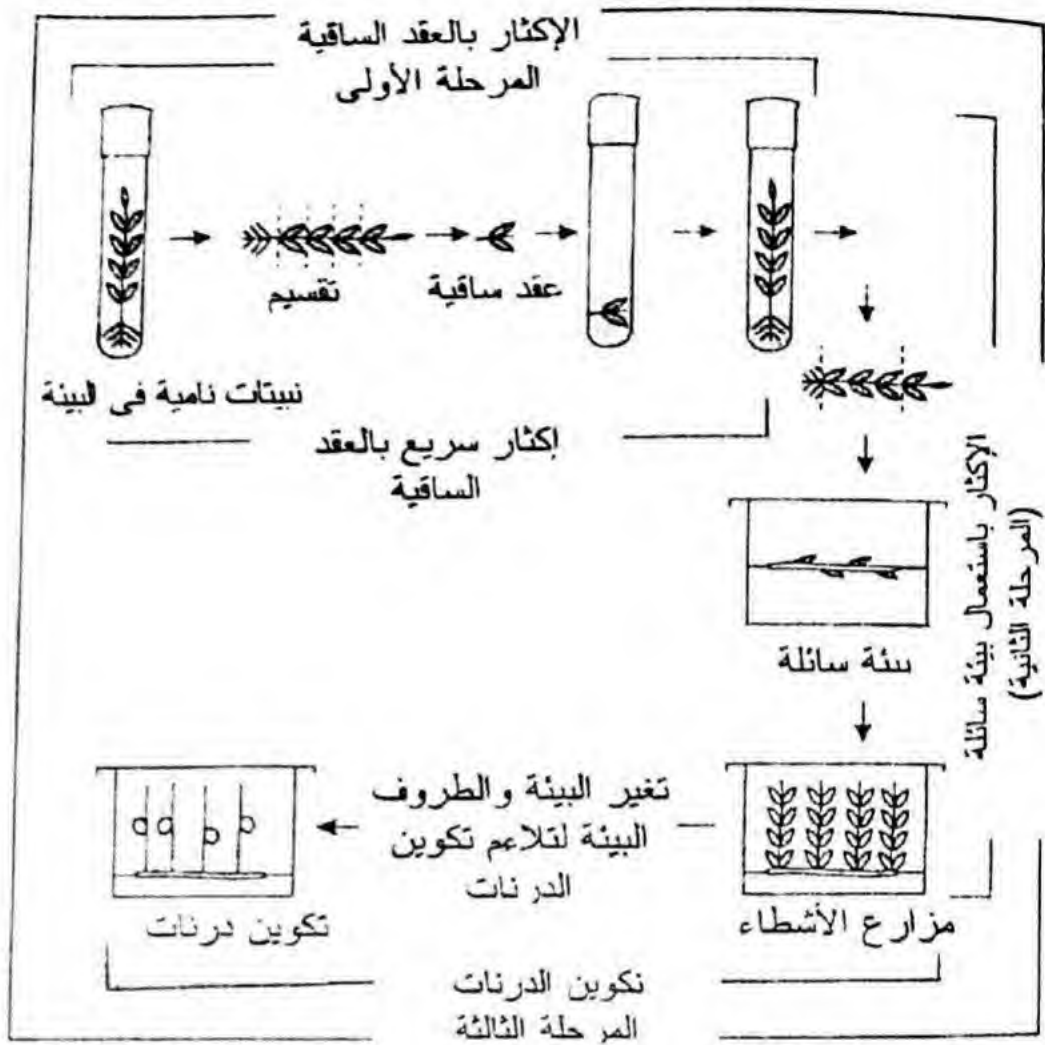
تنظيم تكوين الأفرع

يتوقف نمو وتضاعف عدد الأفرع الجانبية في مزارع قمم الأفرع على وجود منظمات النمو في البيئة خاصة السيٲوكينينات، حيث يضمن ذلك تثبيط السيادة القمية مما يدفع البراعم للنمو. وقد تنجح إزالة القمم النامية فقط أو مع استعمال الهرمونات في تثبيط السيادة القمية (Bhojwani & Razdan, 1996). وغالباً تستعمل عملية قرط القمم النامية عند استخدام الأفرع الموجودة في المزرعة لزراعتها مرة ثانية وفي بعض الأنواع

الخشبية مثل *Acer* و *Betula* و *Malus* يزيد معدل تكوين الأفرع عند إزالة القمم النامية مع وضع الأفرع التي بها برعمين أو ثلاثة أفقياً على سطح البيئة (Thrope *et al.*, 1991) و (Harry & Thorpe, 1999). لكن وجد أن إزالة القمم النامية المعاملة بالسيتوكينينات لم تكن فعالة لتنشيط السيادة القمية في نبات *Yucca* لكن أمكن الحصول على أفرع جانبية عندما شقت القمم النامية طولياً قبل زراعتها. ولسوء الحظ الأفرع الناتجة في حالة زراعة قمم الأفرع لا تكون كلها ناتجة من براعم جانبية. حيث أن بعضها يتكون من براعم عرضية تكونت على الأجزاء المنزرعة مباشرة أو تكونت بطريقة غير مباشرة من الكالس الذي يوجد بوضوح في قاعدة قمم الأفرع المنزرعة. ويصعب في بعض الأحيان التفريق بين مصدر هذه الأفرع. ويمكن بالفحص التشريحي الدقيق التفريق بين ما إذا كانت الأفرع ناتجة من براعم عرضية أو جانبية. وإن كان هناك حاجة للمزيد من الأفرع العرضية يمكن تقسيم القمم النامية إلى أجزاء صغيرة وإعادة زراعتها. ويجب الحد من أو منع تكوين الأفرع العرضية بالتحكم في مستوى الهرمونات المستعملة في بيئة النمو لإنتاج نباتات مشابهة للأم.

٣. زراعة العقد الساقية

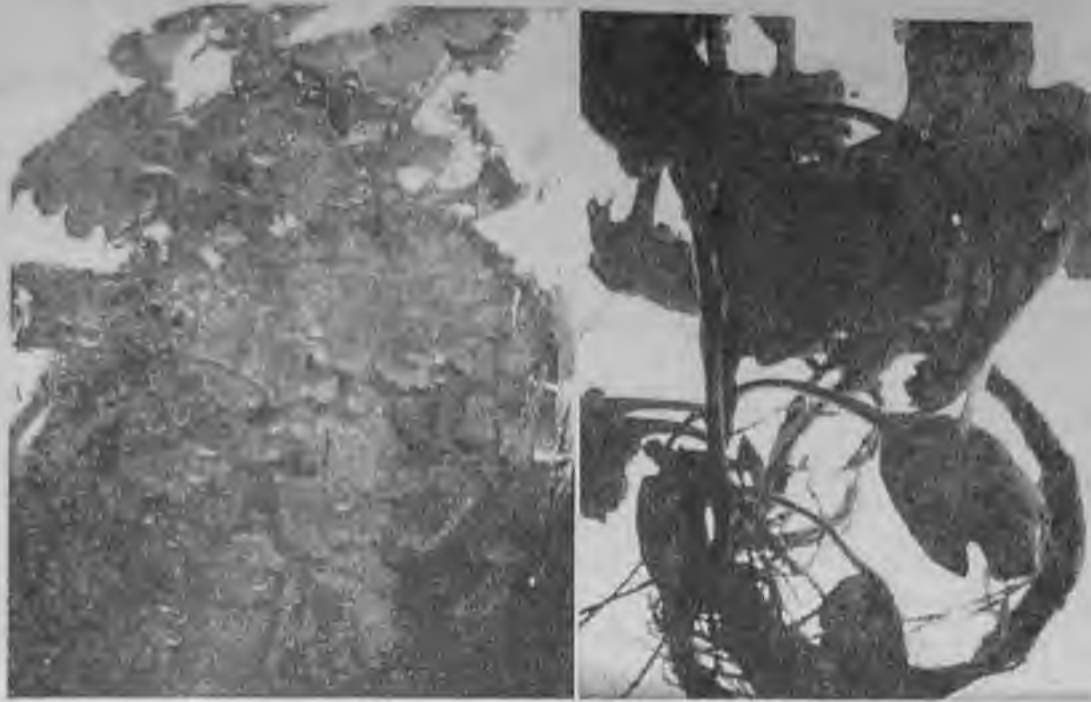
بدأت أسس استعمال طريقة تشجيع الأفرع الجانبية على النمو واستخدامها لإكثار بعض النباتات عام ١٩٢٥ وكان ذلك قبل اكتشاف السيتوكينينات حيث أمكن كسر السيادة القمية بإزالة القمم الطرفية مما شجع على نمو البراعم الإبطية. وكانت أول محاولة لعزل وزراعة برعم وتكوين جذور على الأفرع النامية من نبات الأسبرجس بواسطة Galston في سنة ١٩٤٧. لكن كانت عملية التجذير صعبة فتم استعمال NAA وحفظت الأفرع بعد المعاملة في الظلام مع استعمال بيئة سائله لتكوين الجذور ولكن ظلت عملية التجذير غير ممكنة. وتعتبر طريقة زراعة العقد الساقية مشابهة للطريقة السابقة من حيث استخدام براعم سابقة الكشف والجزء المنزرع عبارة عن جزء من الساق يحمل برعم واحد لكنه ليس طرفياً كما في الشكل رقم (٦-٦).



شكل ٦-٦: إكثار البطاطس بالعقد الساقية لاحظ عدم استعمال البرعم الطرفي (George, 1993).

وتعتبر هذه الطريقة من أكثر الطرق المتبعة لإنتاج نباتات مشابهة للأم وهي تحاكي الطريقة التقليدية لزراعة العقل لكن بالطبع مع إمكانية الحصول على عدد كبير جداً من العقل طول العام (Bhojwani & Razdan, 1996). وعند استخدام القمم النامية يكون طول الجزء المنزرع حوالي ٢ سم وبعد استطالة الجزء المنزرع في بيئة الزراعة وتكوين عدة عقد واضحة فيما يعرف بمرحلة الاستطالة. يتم وضع السوق الناتجة أفقياً على سطح البيئة ويسمى ذلك بالترقيد المعطى، أو يقسم الساق إلى عدة أجزاء كل منها يحتوي على عدة ساقية واحدة ثم تزرع كل عقلة في بيئة جديدة مع ملاحظة إزالة

الأوراق الموجودة. ويتم تكرار ذلك عدة مرات للحصول على عدد من الأفرع يتم دفعها للتجذير بعد ذلك (شكل رقم ٦-٧).



شكل ٦-٧: في اليسار مزرعة للعقد الساقية لنباتات *Chrysanthemum* ويلاحظ تكشف عدد كبير من الأشطاء ، وفي اليمين النباتات بعد مرحلة التجذير وقبل النقل للبيت المحمي.

ليس هناك فرق كبير في مكونات البيئة المستخدمة في زراعة العقد الساقية والقمم النامية ويختلف فقط تركيز ونوع منظمات النمو المستعملة والتي تختلف على حسب النوع النباتي. وغالبا يكون التركيز المضاف من منظمات النمو منخفض حتى لا يشجع تكوين براعم عرضية. وفي بعض الحالات كما اتبع في نبات *Chrysanthemum* يمكن زراعة العقد الساقية دون إضافة أى منظمات نمو للبيئة. ومن عيوب هذه الطريقة قلة عدد النباتات المتكشفة مقارنة بزراعة القمم النامية لكن يميزها انخفاض معدل الحصول على نباتات غير مشابهة للنبات الأم، بمعنى أن معدل حدوث التغيرات الوراثية يكون مرتفع في زراعة القمم النامية بالمقارنة مع زراعة العقد الساقية (George, 1993). ويذكر (Bhojwani & Razdan (1996 أن ظاهرة الكيميرا تكون أعلى في حالة

استخدام العقد الساقية ويرجع ذلك إلى تكوين البراعم العرضية فيعاد توزيع الأنسجة ذات التركيب المختلف في النبات الأم وبالفعل تم تكشف نباتات تفاح مختلفة من حيث لون الثمار عقب تكوين البراعم العرضية مباشرة أو غير مباشرة من الكالس. لكن هناك تباين كبير في هذه الظاهرة ويخضع ذلك للنوع النباتي، لذا يفضل العمل على عدم تكوين كالس باستخدام تركيز عالي من السيتوكينينات (Cassells et al., 1980). وتستخدم هذه التقنية الآن لإكثار عدد من النباتات العشبية من ذوات الفلقة الواحدة والفلقتين والأشجار الخشبية. وتستخدم هذه الطريقة على نطاق تجارى لإكثار عدد من النباتات مثل *Solanum tuberosum, Vitis, Salix babylonica, Araucaria, Hedra helix* وتوجد طريقة أخرى مشابهة لهذه الطريقة تعتمد على استعمال جزء من الساق يحمل أكثر من برعم جانبي بعد إزالة البرعم الطرفي لكسر السيادة القمية ثم يزرع هذا الجزء في البيئة فتنمو البراعم. وقد تستعمل تركيزات عالية من السيتوكينينات للمساعدة في كسر السيادة القمية وتنشيط البراعم. وبعد ذلك يتم دفع الأفرع للاستطالة ثم التجذير. وعموما يتباين التركيز الأمثل من السيتوكينينات طبقاً للنوع النباتي ومرحلة نموه الفسيولوجية، وتستخدم هذه الطريقة لإكثار بعض النباتات مثل القراولة والقرنفل والجريبيرا.

يتضح من ذلك أنه للحصول على عدد كبير من الأشتاء يصبح من الضروري تشجيع نمو البراعم الجانبية وتتفاوت قدرة الطرز الوراثية المختلفة في تحفيز نمو هذه البراعم، أو بمعنى آخر مدى وجود السيادة القمية. فبعض الطرز ينتج عدد قليل من الأفرع الطويلة والبعض الآخر ينتج عدد كبير من الأفرع الجانبية. وقد يرجع السبب في عدم نمو البراعم الجانبية إلى محتواها الزائد من الأوكسين أو لوجود عدد أكبر من المستقبلات الأوكسينية. وبالرغم من أن السيتوكينينات تعمل على كسر السيادة القمية إلا أن هناك طرق أخرى مثل إزالة القمة النامية بطريقة آلية ووضع الأفرع أفقياً على سطح البيئة، أو استعمال بعض المواد الكيماوية لهذا الغرض، فقد وجد أن رش النباتات بمركب Dikegulac يشجع نمو البراعم الجانبية وتستخدم هذه المادة تجارياً لإنتاج نباتات

Azalia كثيفة النمو. وبإضافة تركيز ٥٠٠-١٠٠٠ ملجم/لتر من Sodium dikegulac إلى بيئة نمو مزارع الأشطاء فى الكريز الحلو لوحظ زيادة معنوية فى عدد الأشطاء المتكونة (George & Debergh, 2008).

٤. تكوين الأفرع من البذور

فى بداية الثمانينيات من القرن الماضى استخدمت البذور لإنتاج الأفرع مباشرة حيث عقت البذور وزرعت فى بيئة تحتوى على تركيز عالى من منظمات النمو وبمجرد الإنبات لوحظ تكوين عدد من الأفرع، وقد قدر نظرياً إمكانية إنتاج ١٠ مليون فرع خلال عام من بذرة اللوز (George & Debergh, 2008). ويمكن استعمال الجنين الكامل أو أجزاء البادرات للنباتات كمستأصل نباتى لإكثار الأشجار مغطيات أو معراة البذور (Harry & Thorpe, 1999)، لكن يعيب هذه الطريقة تكشف عدد كبير من النباتات غير المشابهة للأم. وقد قام (Kaparakis & Alderson, 2002) بدراسة معدل تكشف الأشطاء أو الأجنة الجسدية من زراعة بذور الطماطم والباذنجان مباشرة فى بيئة محتوية على تركيزات عالية نسبياً تتراوح بين ١٠ : ٢٠ ملجم/لتر من BA و TDZ. ولاحظا حدوث انتفاخ للجزء القاعدى من السويقة الجنينية السفلى للبادرات التى نمت فى بيئة محتوية على تركيز أعلى من ٥ ملجم/لتر وتكون كالمس عقدى الشكل تكشف بعد ذلك إلى أجنة جسدية. وتشير نتائج التجربة المبينة فى جدول رقم (٦-٢) إلى أن هناك فرق بين الاستجابة لتكوين الأجنة الجسدية وتطورها بتباين تركيز ونوع الهرمون المستعمل. وقد أشارت الدراسة إلى تثبيط تكوين الأجنة الجسدية من بذور الطماطم أو الباذنجان إذا تم زراعة بذور الفلفل مع أى منهما، وحدث تطور عادى للبادرة حتى فى التركيزات العالية من السيتوكينينات. وقد يكون سبب ذلك أن بذور الفلفل تقوم بامتصاص وتكسير السيتوكينينات بسرعة مما يجعل تركيزها غير مناسب لتكوين الأجنة، أو إفرازها مادة أو مواد تثبط التنشيط الوراثى للخلايا المسنولة عن تكوين الأجنة الجنسية.

جدول ٢-٦: تأثير BA و TDZ على إنتاج الأجنة الجسدية من بذور الطماطم والبادنجان (Kaparakis & Alderson, 2002).

المعاملات (ملجم/لتر)		البادنجان		الطماطم	
	% الاستجابة	عدد الأجنة	% الاستجابة	عدد الأجنة	% الاستجابة
BA	٠	--	--	٠.٠	٨٨.٩
٥	--	--	--	٧.٢	٧٥.٠
١٠	--	--	--	٦.٧	٧٢.٢
١٥	--	--	--	٥.٤	٧٥.٠
٢٠	--	--	--	١٠.٠	٠.٠
TDZ	٠	٣٨.٩	٣.٧	٤٢.٩	٠.٠
٥	٥٠.٠	٥.٥	٥.٥	٧٧.٨	٤.٠
١٠	٦٦.٧	٤.٨	٤.٨	٧٢.٢	٣.٧
١٥	٦٠.٠	٢.٠	٢.٠	٦٢.٥	٤.٠
٢٠	٧.٥	٦.٣	٦.٣	٧.٥	٤.٠

ثانياً: الكشف المباشر

تسمى البراعم الموجودة على أى جزء من النبات غير الساق بالبراعم العرضية، وتعتبر عملية تكوين تلك البراعم من العمليات المعقدة فى الإكثار الدقيق ويرجع ذلك إلى ضرورة حدوث العمليات التالية:

١. إحداث تغيرات فى الارتباطات الطبيعية الموجودة بين الخلايا والأنسجة.

٢. إعادة الخلايا المتكشفة إلى حالة عدم التكشف ثم دفعها للتكشف مرة أخرى. إذا لم يتكون كالس قبل تكوين العضو الجديد سميت الطريقة بالتكشف المباشر أما إذا تكون الكالس قبل العضو الجديد سميت بالطريقة غير المباشرة
٣. دفع الأنسجة لتكوين عضو جديد.
٤. نمو وتطور العضو الجديد.

يوجد في الطبيعة العديد من النباتات التي تحمل براعم عرضية مثل *Begonia* و *Bryophyllum* ويمكن دفع هذه البراعم للنمو وتكوين نباتات بزرراعة الأوراق التي تحمل هذه البراعم. والأكثر من هذا أن أوراق نبات *Agava americana* والتي لا تحمل براعم عرضية عند وجودها على النبات يمكن بتقسيمها وزراعتها في بيئة عادية استحثاث تكوين براعم عرضية عليها تنمو وتعطي نباتات كاملة. وبالمثل فإن الأجزاء النباتية المختلفة المصدر والكبيرة الحجم نسبياً والمنزرعة معملياً يمكن أن تحفز لتكوين براعم عرضية أو أجنة جسدية أو حتى براعم زهرية على النسيج المنزرع مباشرة وبدون تكوين الكالس.

لكن لا يضمن ذلك عدم حدوث تغييرات وراثية وإن كان معدلها أقل بكثير بالمقارنة بالتكشف غير المباشر. وربما يكون من الصعب تجنب وجود أخطاء عرضية حتى في حالة الإكثار بالعقد الساقية أو القمم النامية (Bhojwani & Razdan, 1996). ويلاحظ أن الأجزاء المنزرعة صغيرة الحجم تميل غالباً إلى تكوين الكالس ولا تتكشف مباشرة.

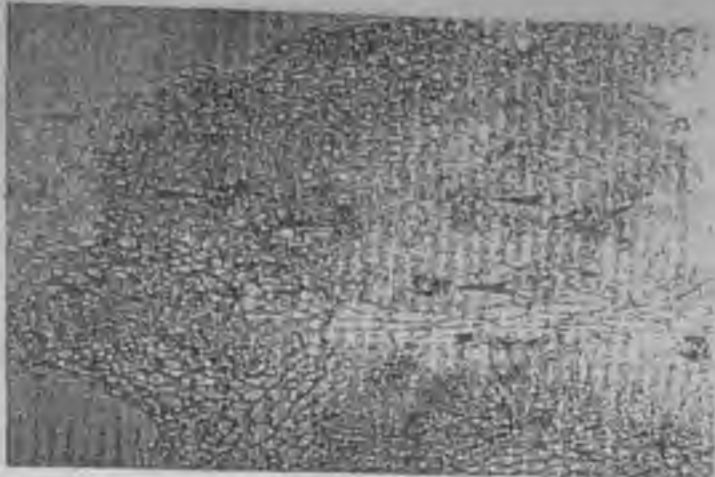
وعادة تكون نسبة تكشف الأجنة أقل نسبياً من تكشف الأخطاء. وأمكن تحديد الظروف المثلى لإكثار عديد من النباتات بطريقة التكشف المباشر. وتلعب نوعية وتركيز ونسبة الأوكسينات والسيبتوكينينات المستعملة دوراً هاماً في الإكثار بهذه الطريقة. لكن يلعب عمر المستأصل النباتي دوراً حرجاً في التكشف المباشر حيث يشير المرجع السابق إلى فقد القدرة على كشف الأخطاء المباشر من الأوراق الفلقية لنباتات *Brassica juncea* بعد ١٠ أيام من الإنبات، وكانت أعلى ما يمكن من بادرات عمرها خمسة أيام.

كذلك فقدت الأوراق الفلقية لبادرات *Pinus radiata* هذه القدرة بعد ثلاث أيام من الإنبات وصاحب ذلك اختفاء اللبيدات منها، لكن تحقق أعلى معدل من الكشف للأوراق الفلقية لأشجار *P. gerardiana* عندما زرعت المستأصلات من البذور قبل الإنبات.

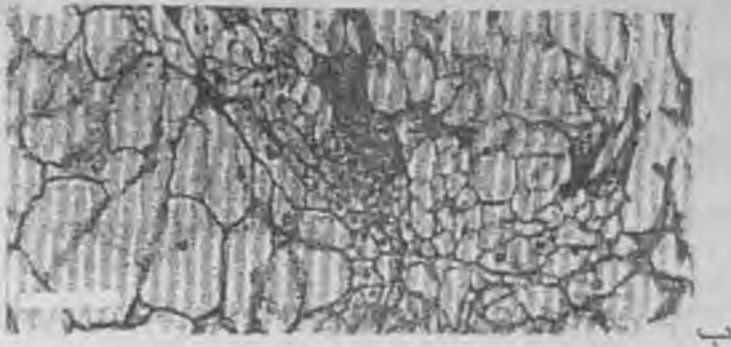
من الثابت صعوبة عملية كشف النباتات من الخلايا الفردية أو البروتوبلاست وكذلك من الكالس بالمقارنة مع كشف الأعضاء الكاملة خاصة تلك حديثة التكوين كالأوراق الفلقية، أو السويقات الجنينية والأجنة غير كاملة التكوين. ولعل هذا هو السبب في قلة استخدام البروتوبلاست كوسيلة لإدخال جينات جديدة للخلية النباتية. كذلك يشير (Bhojwani & Razdan, 1996) إلى استخدام الكشف المباشر للأعضاء والأجنة الجسدية كمادة للانتخاب الوراثي حيث أن النباتات المتكشفة تشتمل على بعض الاختلافات الوراثية والتي تعرف بـ *somaclonal variations*. وقد تتكشف الأشطاء أو الأجنة الجسدية *somatic embryo* من خلايا ميرستيمية حيث تنشط بعض الخلايا في الانقسام خلال يومين من الزراعة ويزيد معدل الانقسام حتى تتكون بدايات المراكز الميرستيمية. وتسمى كتلة الخلايا الميرستيمية الكروية الشكل والتي تنتج من انقسام خلايا النسيج المنزوع بـ *meristemoids* وتتكون هذه المراكز بصورة عشوائية في النسيج المنزوع كما هو موضح بالشكل رقم (٦-٨).

لكن لا يعرف بصورة واضحة ما إذا كان مركز الميرستيم ينشأ من خلية واحدة أو أكثر. وهناك دراسة تشير إلى إمكانية تكوين مركز ميرستيمى من خلية واحدة من خلايا البشرة وتكشف من هذا المركز ٢٢ ساق. ويمكن القول أن البرعم المتكشف ناتج من خلية واحدة لو كانت هناك طفرة من النوع *solid mutant* بعد معاملة النسيج بإحدى المطفرات. أما إذا كان الفرع المتكشف به كيمييرا فإن الكشف يحدث من عدد من الخلايا المختلفة الناتجة من انقسام خلايا مختلفة. لكن من الجدير بالذكر أن الطفرات قد توجد أيضاً حتى في النباتات الناتجة من خلية واحدة لحدوث طفرات أثناء الانقسام (Gahan & George, 2008).

شكل ٨-٦: (أ) تكوين المراكز
الميرستيمية والعشائر إليها بأسهم
بصورة عشوائية في المستأصل
النباتي المنزوع من أعناق
أوراق نبات *Echinacea*
purpurea



(ب) صورة مكبرة (المستقيم
الموضح - طوله ٥٠
ميكرومتر) (Choffe et al.,
2000)



ج التكشف المباشر للأشطاء من
أوراق *Ruta graveolens*



وقد تتكون براعم عرضية أحيانا على أوراق النباتات الموجودة داخل المزرعة
عندما تنشئ الأوراق لأسفل وتلامس سطح البيئة. وهذه طريقة سهلة وجيدة لإكثار العديد
من النباتات خاصة إذا كانت الأجزاء المسنة لها القدرة على تكوين براعم عرضية. كذلك
فإن عدم انفصال المرحلة الأولى من زراعة الأنسجة كما قسمها Murashige (انظر
الفصل الرابع) عن المرحلة الثانية يعتبر ميزة فيمجرد نقل الجزء المنزوع إلى البيئة

يحدث التكتشف. ويمكن استمرار تقسيم الأجزاء الناتجة وزراعتها في نفس البيئة للحصول على عدد أكبر من الأشرطة. وازيادة معدل إنتاج البراعم يمكن فصل عدة مجموعات منها بعد تكوينها في البيئة الشبه صلبة ونقلها إلى بيئة سائلة حيث تسبب الحركة المستمرة للبيئة تفتيت المراكز الميرستيمية وتكوين العديد منها. وبعد تكوين الأشرطة تنقل إلى بيئة شبه صلبة للتجذير. ويذكر (Pierik 1987) أن هذه الطريقة على نطاق تجارى لإكثار بعض النباتات مثل *Saintpulia* و *Gerbera* و *Begonia* و *Cacti* و *Lilium*.

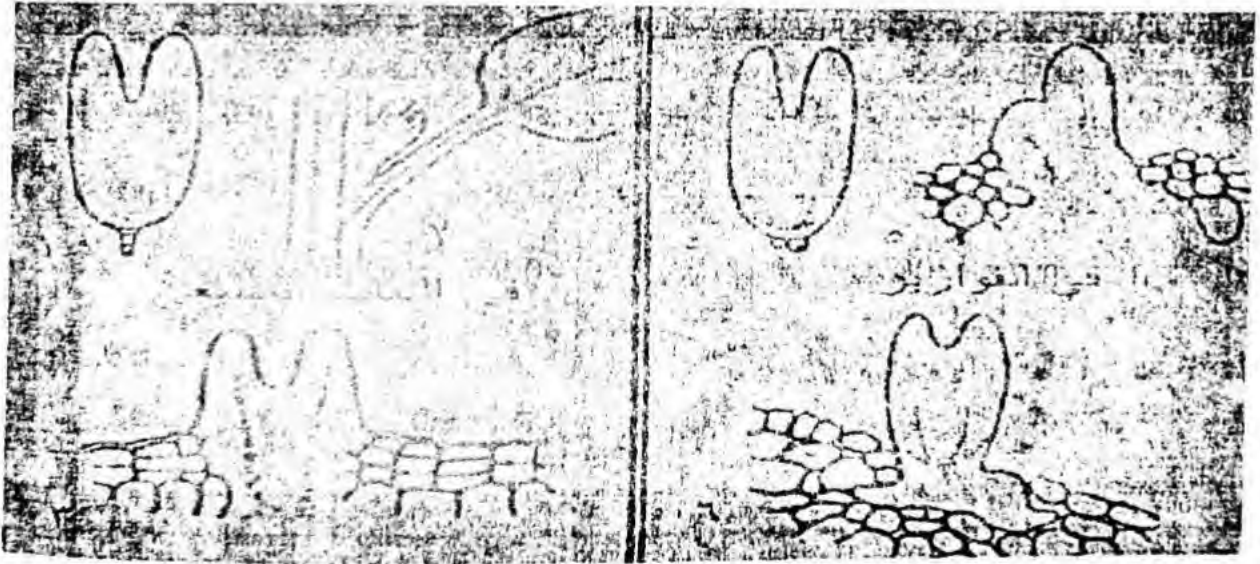
ومن الناحية النظرية يمكن بطريقة ما دفع الخلية النباتية إلى أن تستعيد قدرتها على تكوين جنين دون الحاجة لوجود الجهاز الخاص بتكوين وتطور الجنين. وعمليا ليست كل خلايا النسيج المنزوع مؤهلة من الناحية الوراثية وتم تحديدها مسبقا لتسلك هذا المسلك من التكتشف. وتعمل ظروف الزراعة المعملية المثلى على دفع الجينات المسنولة عن ذلك للتعبير عن نفسها، ولا يعرف حتى الآن على وجه الدقة ما إذا كانت كل خلايا أنسجة النيووسيلة مؤهلة لتكوين أجنة جسدية أم لا، لكن تحتفظ أنسجة النيووسيلة بالقدرة على إنتاج أجنة جسدية لمدة طويلة عند زراعتها معمليا. ويمكن أن يطلق على التراكيب الميرستيمية والمعروفة بـ *protocorm* التى تتطور أثناء إكثار بعض أنواع الأوركيد أجنة جسدية.

ورغم الاعتقاد الكبير فى تشابه العمليات الحيوية أثناء تطور الأجنة الجسدية مع الأجنة العادية فإن بعض الأبحاث تثبت وجود تباين على المستوى الخلوى وفى المشابهات الإنزيمية وكذلك فى البروتينات التى تخلق أثناء ذلك. وحتى الثمانينيات من القرن الماضى كانت الأبحاث مهتمة بتحديد العوامل التى تشجع تكوين تراكيب تشبه الجنين الجسدى. وعند الانتقال إلى المجال التطبيقى لاستخدام الأجنة الجسدية فى الإكثار اتضح أن أغلبها غير قادر على الإنبات لعدم نضجها من الناحية الوظيفية والكيموحيوية، ومن هنا كانت الأبحاث فى العقد التالى حول إدراج مرحلة النضج للأجنة بعد

تكوينها (Von Arnold, 2008). وهناك توجه الكبير في الاعتماد على الإكثار بالأجنة الجسدية سواء بالطريقة المباشرة أو غير المباشرة كبديل عن تكشف الأشرطة بصرف النظر عن الثبات الوراثي لأنها تقلل كثيراً من تكاليف الإنتاج لإمكانية استعمال الميكنة. وبقي القول أن لدراسة تكشف الأجنة في مزارع القوارير أهمية كبيرة في إلقاء الضوء على الأساس الخلوي لعملية الكشف والتطور في النباتات الراقية (Bhojwani & Razdan, 1996) و (Von Arnold, 2008) و (Neumann et al., 2009).

الفرق بين تكشف الأجنة والأشرطة

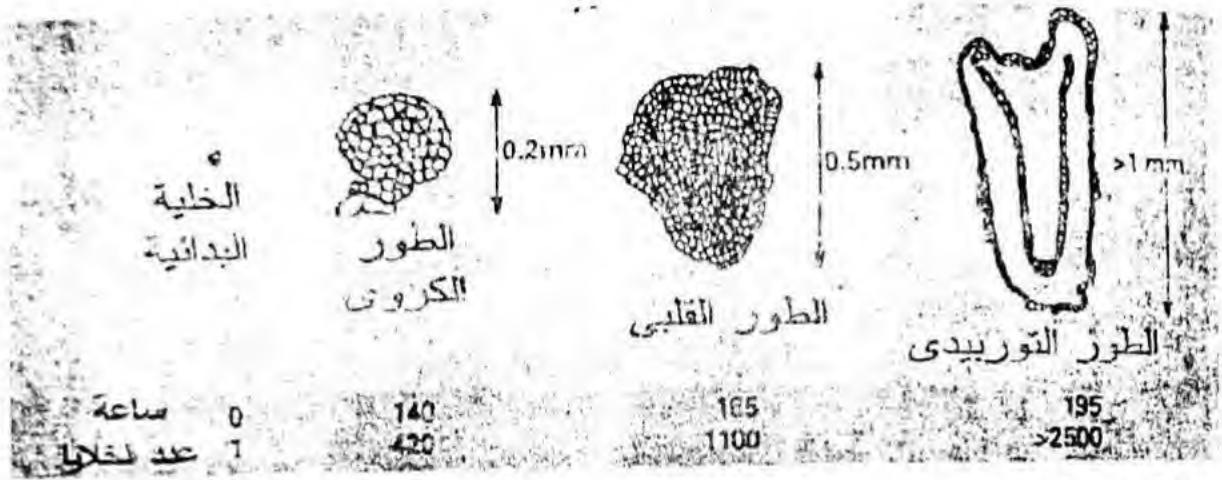
في حالات كثيرة يكون من الضروري تحديد طريقة الكشف للنباتات المستولدة هل هي بالتكشف المباشر أو غير المباشر (شكل رقم ٦-٩) لأهمية ذلك في برامج التربية على سبيل المثال. ويمكن التفريق بين النباتات الناتجة من كشف الأشرطة عرضياً وتكشف الأجنة الجسدية على أساسين:



شكل ٦-٩: رسم تخطيطي يبين الفرق التشريحي بين النهاية القاعدية للجنين (١، ٤، ٦) وللأشرطة (٥، ٣، ٢) في القوارير وفي النبات الطبيعي. الخطوط المتقطعة تشير إلى الأوعية الناقلة في العضو (Bhojwani & Razdan, 1996).

١. يبدأ تكشف الأجنة سواء الجسدية أو الجنسية من خلية واحدة ويبين شكل رقم (٦-١٠) مراحل تكوين الأجنة الجسدية في نباتات الجزر. ومن ثم يلاحظ وجود

القطبية في الجنين المتكون أى وجود قمة ميرستيمية للأشطاء وأخرى للجذور. ويكون هناك اتصال مغلق للأوعية الناقلة بين المجموع الخضرى والجذرى. أما الأشطاء المتكشفة عرضياً فلا تحتوى على قمة ميرستيمية للجذور لكن من الممكن أن تتكون الجذور عرضياً فى مرحلة لاحقة لتكشف الأشطاء كما فى الشكل (٦-١١).

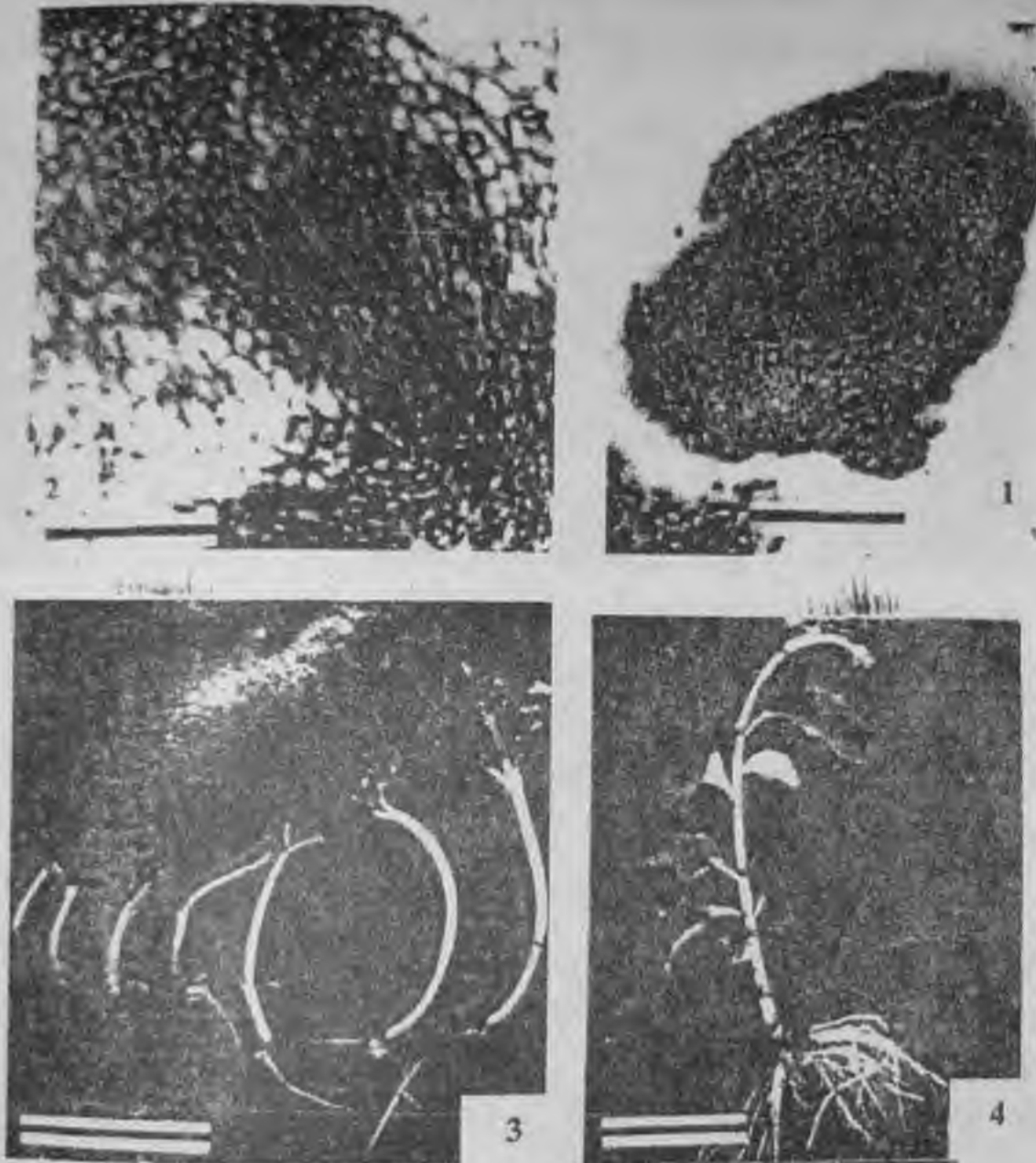


شكل ٦-١٠: مراحل تطور تكوين الأجنة الجسدية فى الجزر (Stafford & Warren, 1991)

٢. لابد من وجود البروتينات المميزة للأجنة فى الأوراق الفلقية للأجنة الجسدية المتكشفة على العكس من أوراق الأشطاء المتكشفة عرضياً. وتوضح دراسة Maria de los et al. (1997) على تكشف الأجنة الجسدية من نباتات قصب السكر هذا التغيير فى البروتين حتى فى مرحلة تكوين الكانس.

٣. وعلى الرغم من الاعتقاد بأن الأجنة الجسدية تنشأ من خلية واحدة والأشطاء تتكشف من عدد من الخلايا فإن بعض المشاهد تمثل عدم إنتاج أشطاء تنضج بها ظاهرة الكيميرا عقب تعريض النبات الأم للإشعاع مثلاً، وكذلك إنتاج نباتات محورة وراثياً بنقل الجينات إليها بالوسائل المختلفة حيث ينقل الجين إلى خلية واحدة تشير إلى أن الأشطاء قد تنشأ من خلية واحدة فى بعض الحالات. وفى الوقت الذى يعتبر فيه تكوين الأجنة الجسدية غير المباشرة ذو أهمية كبرى فى الإكثار الخضرى فإن تكوين الأجنة المباشر غير فعال فى الإكثار وذلك لانخفاض معدل تكوينها وتكوين أجنة ثانوية تلتصق بها وتشوهها أو تعيق إنباتها. ولسهولة إنتاج الأجنة الجسدية بالمعلق الخلوى فإنها تقلل من استعمال الأيدي العاملة فى

عمليات الزراعة المختلفة ويمكن من استخدام الطرق الآلية في الإكثار الخضري، مما يقلل من التكاليف.



شكل ٦-١١: قطاع في كالس نبات *Cephaelis ipecacuanha* يوضح التكشف غير المباشر للجنين الجسدي (١، ٢) يلاحظ وجود بداية تكوين قمة الجذر rp والأوعية الناقلة pvs في المجموع الخضري ويلاحظ الاتصال بينهما، (٣) مراحل مختلفة من إنبات الأجنة، (٤) نبات كامل بعد الأقلعة. (المستقيم الموضح يمثل طول ١٠٠، ١٠٠ ميكرومتر، ٢٠، ٢٠ مم على التوالي) (Rout et al., 2000).

ثالثاً: التكشف غير المباشر في مزارع الكالس

لقد حظى تكوين الكالس ومن ثم المعلق الخلوي بدرسه العديد من العلماء وقد صنف (Collin & Edwards 1998) كتاباً في مزارع الكالس والمعلق الخلوي والتطبيقات العملية لهذا في الإكثار الدقيق عبر تكوين الأجنة الجسدية بالإضافة إلى إنتاج المواد الثانوية في المفاعلات الحيوية. وفي هذا الجزء، سنقتصر الإشارة إلى بعض الأساسيات الخاصة بمزارع الكالس والمعلق الخلوي. ويمكن الرجوع إلى المصدر المشار إليه وكذلك (George 1993) للمزيد من التفصيل حول ما سيرد في هذا الجزء. يستهل تكوين الكالس بارتداد الخلايا المتكشفة للمستأصل النباتي إلى حالة عدم التكشف وهذا الارتداد غاية في الأهمية حيث أنه يعطى الخلايا البالغة المتكشفة فرصة للتعبير عن تركيبها الوراثي الخاص بإعادة التكشف. وللخلايا التي ما زالت في طور الانقسام المقدرة على الارتداد إلى الحالة الميرستيمية وتكوين الكالس بدرجة أعلى من تلك المتكشفة. وتتحكم منظمات النمو الداخلية والخارجية المضافة إلى وسط النمو بدرجة عالية في هذا الارتداد والانقسام، وبتأثير تلك العوامل خاصة منظمات النمو قد تستمر الخلايا في مرحلة تكوين الكالس وعدم التكشف، أو تدخل مرحلة التكشف (Neumann et al., 2009). ويترتب على ذلك الانقسام تكوين كتلة غير متميزة من الخلايا يطلق عليها لكالس.

وتستجيب أغلب الأجزاء النباتية للنباتات ذات الفلقتين في القوارير للظروف المشجعة لتكوين الكالس على العكس من ذوات الفلقة الواحدة حيث يقتصر تكوين الكالس على الأجنة، والأوراق حديثة التكوين، والعقد الساقية، وكذلك الثورات الزهرية. وكانت غاية تكوين الكالس في مزارع الأنسجة في عام ١٩٣٩ عندما لاحظ Gautheret تحول

الأجزاء التي تم زراعتها من أنسجة جذور الجزر في وسط غذائي يحتوى على أملاح معدنية وجلوكوز وبعض الفيتامينات و IAA إلى كتلة غير متكشفة من الخلايا. ولم تكن لهذه الخلايا آنذاك فائدة تطبيقية في الإكثار الدقيق للنباتات، إلا أنه بتقدم زراعة الأنسجة استطاع كثير من الباحثين إنتاج أشطاء من كالس العديد من النباتات باستخدام أجزاء نباتية مختلفة متضمنة أنسجة الكامبيوم، اللحاء، القشرة، النخاع بل ومن أنسجة الخشب أحياناً. وتقسم مراحل نمو الكالس إلى ثلاث مراحل على أساس عدد الخلايا في العشيرة وأيضها وبلوغ الكالس شكله النهائى، وهذه المراحل هي:

١. **مرحلة الاستحثاث Induction:** وهى عملية إعداد الخلية للانقسام وتتميز بنشاط ائضى عالى وتخليق بعض الجزيئات الدقيقة الضرورية للانقسام.
٢. **مرحلة الانقسام Division:** وفيها تتحول الخلية غير الميرستيمية إلى خلية ميرستيمية ذات معدل انقسام عالى ويقل فيها متوسط حجم الخلايا.
٣. **مرحلة التكشف Differentiation:** حيث تحدث زيادة فى حجم الخلايا ويزيد حجم الفجوات العصارية ويقل معدل السواد المسنولة عن الانقسام ويحدث اتزان بين عمليتى الانقسام والاستطالة. ويعترض البعض على استعمال مصطلح differentiation فى هذه المرحلة حيث أن التغير الحادث يكون مجرد تغيير سيتوبلازمى فقط دون تغيير واضح فى الشكل الظاهرى كما يئنى المصطلح- لكن بالطبع تقود هذه التغيرات السيتوبلازمية فى النهاية إلى تكشف الخلايا وتميزها كأن تتحول بعض خلايا الكالسعى سبيل المثال إلى خلايا خشب. ويعتبر تكشف بعض الخلايا إلى خلايا خشب خطوة أولى فى تكشف الكالس إلى أشطاء أو جذور.

وقد بينت دراسة Thorpe & Murashige (1970) على تكشف كالس نباتات الدخان وجود تباين على مستوى الأحماض الأمينية والبروتينات والكربوهيدرات فى الكالس غير المتكشف وذلك المتكشف. ورغم أن خلايا نوعى الكالس كان ذات محتوى

مماثل من DNA فإن خلايا الكالس المتكشفة احتوت على تركيز أعلى من RNA والبروتين. وكذلك سجل اختلاف كبير في محتوى الخلايا من النشا، ومن المعروف أن لتجميع النشا في الخلايا دوراً واضحاً في تكشف الأخطاء حيث لاحظ ما يلي: (أ) حدوث تجميع كثيف للكربوهيدرات في الخلايا التي تتحول إلى خلايا متكشفة دون غيرها. (ب) لا تتكون المراكز الميرستيمية في المناطق التي تعاني من نقص تراكم النشا. (ج) يسبق ترسيب النشا في الخلايا مظاهر عملية التكشف ويصل أعلى تركيز بعد ١١ يوم من استئصال الزراعة بدء تكوين المناطق الميرستيمية بعد ذلك بثلاثة أيام. (د) إذا تم معاملة الكالس بحامض GA_3 فإن تكوين المناطق الميرستيمية يُثبط لمنع الحامض السابق عملية تخليق النشا وبالتالي لا يصل تركيزه إلى الحد الضروري للتكشف. وربما يعمل النشا والسكر المضاف للبيئة كمصدر للطاقة الضرورية لعملية التكشف. ويخلص

(Bhojwani & Razdan, 1996) نتائج تجارب أخرى مشابهة تبين سرعة عملية التنفس مع زيادة تركيز العديد من الإنزيمات مثل phosphatase و ATPase و succinate dehydrogenase مع زيادة تخليق البروتين وانخفاض محتوى اللبيدات والسكريات الذائبة.

يتم الحصول على الكالس بتعقيم النسيج النباتي ثم نقله إلى البيئة المغذية الشبه صلبة عادة، وغالباً تُحفظ المزرعة في الظلام. ويمكن بعد ذلك نقله واستمرار نموه في بيئة سائلة. وتختلف قدرة النباتات على تكوين الكالس اعتماداً على العوامل المؤثرة على النمو والتكشف في زراعة الأنسجة، لكن عموماً قدرة النباتات على تكوين كالس أعلى من قدرتها على التكشف. ورغم أن البيئة التي استعملت في البداية لتكوين الكالس كانت بسيطة التركيب إلا أن البيئات المستعملة الآن معقدة ولا بد أن يضاف إليها بعض منظمات النمو وخاصة أحد الأوكسينات ($IAA, NAA, 2,4-D$)، ويختلف التركيز من ٠.٠١-١٠ ملجم/لتر من نوع نباتي إلى آخر. وتختلف المدة اللازمة لتكوين الكالس من عدة أيام إلى عدة أسابيع. وبفحص التغير في الشكل العام لكالس الدخان وجد أن معظم النمو يحدث في

المنطقة الملاصقة للبيئة. وباستمرار النمو يحدث اختلاف في معدل نمو وتضاعف الخلايا في الأجزاء المختلفة من الكالس. ومن المعروف أن زيادة عدد وحجم الخلايا البكتيرية والفطرية تتم عقب الطور التضاعفي مباشرة ويتوقف معدل النمو الخارجى للمستعمرة على مقدار الإمداد بالمواد الضرورية للنمو. وبهذا يكون معدل النمو فى المحيط الخارجى للمستعمرة خطياً، أما فى الكالس فإن معدل النمو قد لا يكون خطياً لأن النمو والانقسام يحدثان نتيجة لتأثير الجرح كما سبق ذكره.

فى الغالب تكون خلايا الكالس غير متماثلة بوجود أكثر من نوع من الخلايا فى نفس الكالس قد تكون احدها ذات قدرة على التكاثر دون الأخرى. وهذا التباين يمكن أن يكون فى اللون، الشكل الظاهري، التركيب، النمو، أو عمليات الأيض، فحتى الكالس الذى يبدو أنه متماثل تماماً فى المظهر الخارجى قد يحتوى على بعض الخلايا ذات النشاط الأيضى المختلف. وربما يرجع هذا التباين إلى اختلاف التركيب الوراثى حتى داخل نفس النوع أو اختلاف الأنسجة التى كونت الكالس، أو لتأثير الظروف البيئة ومكونات البيئة. ويمكن للخلايا ذات القدرة على التكاثر الاحتفاظ بهذه القدرة فترة طويلة ويقف نشاط الخلية كأن تحفظ فى النيتروجين السائل بطريقة خاصة، لكن باستمرار الزراعة فى القوارير قد تتراكم بعض التغييرات الوراثية التى عن شأنها أن تفقد الخلية القدرة على التكاثر (George, 1993). ويلاحظ فى حالة استعمال عضو نباتى مثل الجذر لتكوين الكالس أن خلايا الكالس المتكونة من الخلايا المختلفة فى الجذر ليست لها نفس القدرة على النمو وربما يطغى أحد هذه الأنواع على الطرز الأخرى وتكون هى السائدة فى الكالس. ويتبين من ذلك أن الكالسين المتكونين من نفس النسيج والناميين فى بيئتين مختلفتين لا بد وأن ينظر لهما على أنهما سلالتين مختلفتين. ويجب العمل على إيجاد الظروف المثلى للحد من درجة التباين التى توجد بين خلايا الكالسات المختلفة والخلايا فى نفس الكالس. وإذا كان برنامج الإكثار الدقيق معتمداً على الكالس، فإن

الكالس لابد أن يفى بشرطين أساسيين هما الاحتفاظ بالقدرة على الكشف باستمرار التقسيم والنقل إلى بيئة جديدة والثبات الوراثي.

يتوقف الشكل الظاهري للكالس على أسلوب نموه فباستمرار نمو الكالس يتم دفع الخلايا إلى أعلى والخارج بعيداً عن سطح البيئة. وعلى ذلك يحدث تدرج في تركيز المواد الغذائية ومكونات البيئة والغازات في الخلايا بالقطاعات المختلفة من الكالس. ويحدث أيضاً تدرج في تراكم نواتج عمليات البناء فالخلايا الملاصقة للبيئة تفقد تلك المواد أسرع من الخلايا البعيدة عن سطح البيئة. ويؤثر حتماً التدرج في توزيع المركبات المختلفة بطريقة إيجابية أو سلبية على أسلوب نمو وتكشف الكالس. ويمكن تقليل التباين الحادث في الكالس والحصول على درجة عالية من التماثل بإتباع نظام محدد ودقيق لتقسيم وإعادة زراعة الكالس على فترات قصيرة بحيث تتم زراعة الأجزاء المتمثلة ظاهرياً بمعدل نمو الخلايا في المعلق الخلوى يكون سريع جداً بالمقارنة مع خلايا الكالس في البيئة شبه الصلبة كما تكون درجة التشابه بين الخلايا في المعلق الخلوى عالية. وتلك من المميزات التى تجعل المعلق الخلوى يستخدم فى بعض الأغراض التى لا يفضل فيها استخدام الكالس.

فى معظم الحالات يتم الحصول على الكالس بوضع الجزء النباتى فى بيئة شبه صلبة محتوية على تركيز عالى من الأوكسين وتركيز منخفض من السيٲوكينينات. وقد يتم تقسيم ونقل الكالس المتكون مرة أو أكثر إلى بيئة جديدة بنفس التركيب بغرض استمرار النمو. أو ينقل الكالس إلى بيئة أخرى مختلفة فى محتواها من منظمات النمو فيضاف تركيز أعلى من السيٲوكينينات وأقل من الأوكسين لإحداث التكثف. ولما كان الكالس الناتج من نفس الجزء المنزرع غير متجانس فى صفاته ومنها قدرته على الكشف عالباً، فإنه يجب العمل عند تقسيم ونقل الكالس استعمال الأجزاء التى يعتقد أنها مناسبة دون غيرها. وذلك لأنها قد تعيق وتنافس الأجزاء ذات القدرة على الكشف. وقد

اتضح أن هذه الظاهرة في إكثار نباتات *Pelargonium* وغيرها من النباتات (Holdgate, 1977). لكن يتطلب انتخاب الكالس المتسم بالقدرة على الكشف خبرة عالية، وعموما الكالس ذو المظهر المائي المفكك friable أقل قدرة على الكشف من الكالس المتماسك compact أو المتكون عليه عقد organised callus. ويعيب استعمال الكالس كطريقة للإكثار زيادة معدل حدوث تغير وراثي، لكن إذا أمكن التحكم في هذا المعدل فمن الممكن الاعتماد على الكالس في الإكثار الخضري.

لوحظ زيادة في سرعة نمو الكالس إذا نقل بعد تفتيته إلى أجزاء صغيرة إلى بيئة سائلة. وتم استخدام هذه الطريقة للإسراع في الإكثار الخضري لعدد من النباتات. فعلى سبيل المثال، إكثار نبات *Hemerocallis* بطريقة الكشف غير المباشر يتطلب ١٣٥ يوم من بدء الزراعة حتى نقل النباتات إلى الحقل. وتعتبر الفترة اللازمة لتكوين الكالس ذو القدرة العالية على الكشف هي الأطول في هذا البرنامج، وأمكن تقليل المدة اللازمة للإكثار بنقل الكالس المتكون في البيئة شبه الصلبة إلى بيئة سائلة للإسراع في إكثاره. وبعد زيادة العدد يتم نقل كتل الكالس المتكونة إلى البيئة شبه الصلبة مرة أخرى لدفعه للكشف. لكن التركيز المطلوب من منظمات النمو لدفع الكالس إلى تكوين المعلق الخلوي أي تفكك الخلايا يكون عالي بالقدر الذي يثبط الكشف بعد ذلك. والمشكلة الأخرى أن التغيرات الوراثية تزيد بطول المدة من الزراعة حتى الكشف (Pierik, 1987).

التكشف غير المباشر للأشطاء

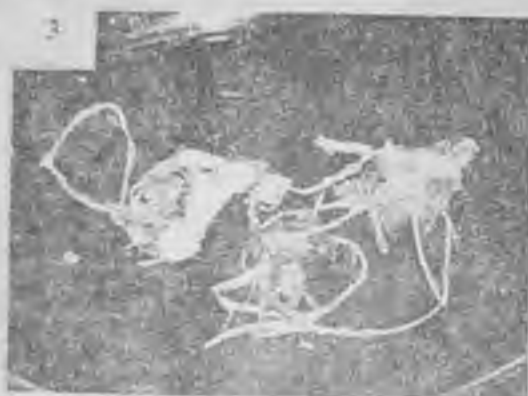
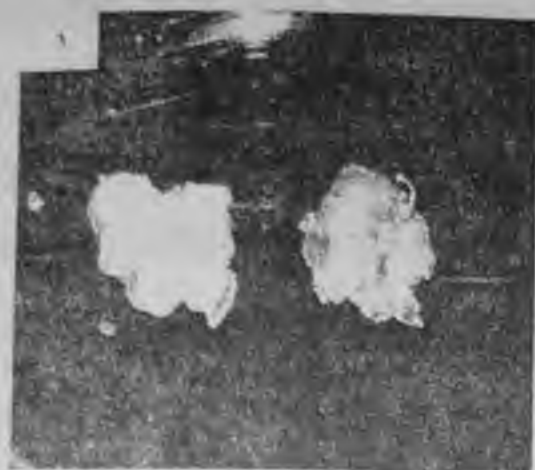
بعد اكتشاف السيوكينينات أوضح كلا من Miller في سنة ١٩٥٥ و Skoog في سنة ١٩٥٧ أن الكالس المتكون من أنسجة نبات الدخان قد يستمر على حالته دون كشف أو يتكشف منه جنور أو أشطاء عند إضافة نسب محددة من السيوكينينات والأوكسينات إلى بيئة النمو، حيث تشجع هذه الظروف تحويل الخلية إلى الحالة الميرستيمية واستعادة قدرتها على الكشف. فإذا كانت نسبة السيوكينينات إلى

الأوكسينات مرتفعة فإن ذلك يدفع الكالس إلى تكشف أشطاء والعكس يشجع تكشف الجذور، أما التركيز المتوسط من الأوكسينات والسيتوكينينات يشجع استمرار نمو الكالس على حالته.

ويعد عمر الكالس عاملاً هاماً في الكشف حيث تفقد كالسات معظم الأنواع النباتية قدرتها على الكشف بعد فترة من زراعتها مع وجود تباين وراثي في قدرة الكالس على الكشف. وتجدر الإشارة إلى أنه إذا كانت البيئة مشجعة لتكوين جذور فهي غالباً غير مناسبة لتكشف الأشطاء، وبصفة عامة فإن قدرة الكالس على تكوين جذور أعلى من قدرته على تكوين أشطاء. لكن ربما تتكشف أشطاء وجذور في نفس البيئة لكن دون أن يكون بينهما ارتباط تشريحي في الأوعية الناقلة. غالباً تنتج الأجزاء الميرستيمية للبادرات حديثة الإنبات كالسات لها قدرة أعلى على الكشف على العكس من الأجزاء غير الميرستيمية للأعضاء المسنة. وتحت نفس الظروف قد يحدث تكشف للأجنة الجسدية والتي قد يظن أنها أشطاء لكن يميز النباتات الناتجة من إنبات الأجنة الجسدية وجود الأوراق الفلقية والبروتين المميزة للأجنة. وعادة ما يكون إنتاج الأشطاء من الكالس بطئ نسبياً في معظم النباتات، وغالباً تكون البيئة المشجعة لنمو الكالس مثبطة للكشف المباشر. لكن في بعض الأجناس يحدث تكشف في الكالس تحت نفس ظروف الزراعة. تعطى النباتات ثنائية الفلقة كالس ذو قدرة تكشفية عالية وذلك من أجزاء نباتية متباينة كأجزاء الورقة، السوق، الجذور، الأجزاء المخزنة، قمم الأفرع، أنسجة البادرات (George, 1993). ويوضح شكل رقم (٦-١٢) مراحل الحصول على نباتات كاملة من كالس الأوراق الفلقية لنبات الطماطم.

أما في النباتات أحادية الفلقة فإن الأنسجة التي يمكن أن تعطى كالس ذو قدرة تكشفية تكون محدودة وغالباً تتركز في الأجنة، والأوراق حديثة التكوين، والعقد الساقية والأجزاء الزهرية غير الناضجة. أما في الأشجار فإن الأنسجة ذات القدرة الكشفية هي

القريبة من الحزم الوعائية بالسوق والجذور. ومن الضروري أن تستخدم أنسجة ذات خلايا قادرة على الانقسام لإرتباط ذلك بالقدرة على التكشف.



شكل ٦-١٢: مراحل زراعة الأنسجة لنباتات الطماطم. (١) الأوراق القلبية في بداية تكوين الكالس، (٢) تكشف الأشطاء اعتمادا على منظمات النمو الموجودة بالبيئة، (٣) تكشف الجذور اعتمادا على منظمات النمو الموجودة بالبيئة، (٤) نقل الأشطاء المتكشفة إلى بيئة التجذير، (٥) أقلعة النباتات تحت الأغشية البلاستيكية، (٦) النباتات المنقولة للحقل بعد الإقامة.

الكالس المتعضون

سبق القول أن تكشف البراعم يتم من مراكز ميرستيمية تتكون عشوائياً بالكالس وبذلك تكون عرضة لحدوث تغيرات وراثية متباينة. لكن لوحظ أحياناً تكوين نوع من الكالس يطلق عليه *organized callus* أو *semi-organized callus* وتزد احتمالية الحصول على هذا النوع من الكالس عند استخدام أنسجة ميرستيمية. وهذا الكالس عبارة عن كالس متكون من مجموعة من الخلايا الميرستيمية السطحية التي توجد فوق مركز من الخلايا ذات الفجوات العصارية الكبيرة والتي تعمل كوسيلة لتدعيم وتغذية الخلايا الميرستيمية.

وتعمل ميرستيمات الطبقة الخارجية على تثبيت انقسام الخلايا الموجودة بالمركز. ومن أمثلة هذا النوع، الكالس الناتج من زراعة القمم الميرستيمية لنباتات *Rhododendron* فيبدو الكالس كحببيات ميرستيمية صغيرة خضراء اللون تتكشف بدورها إلى أفرع. كذلك الكالس المتكون في قواعد الأفرع في بعض مزارع الأشطاء. ويضمن هذا النوع من الكالس عدم حدوث تغير وراثي بمعدل مرتفع في النبيتات الناتجة. لكن تتوقف إمكانية الحصول على هذا النوع من الكالس على الطريقة المتبعة في الزراعة فيجب ألا تعمل منظمات النمو على سرعة انقسام الخلايا الموجودة بالمركز. وفقد الكالس المتعضون لنبات *Anthurium* هذه الصفة عند تقسيمه ونقله عدة مرات إلى بيئة جديدة. لكن باستبعاد الكالس غير المتعضون من الزراعة أمكن المحافظة على هذا التركيب مدة أطول وتكشفت أعداد أكبر من النباتات (Geier 1986). وقد استخدم الكالس المتعضون في إكثار نباتات القرنفل وذلك بتقسيم القمم النامية قبل زراعتها.

التكشف غير المباشر للأجنة الجسدية

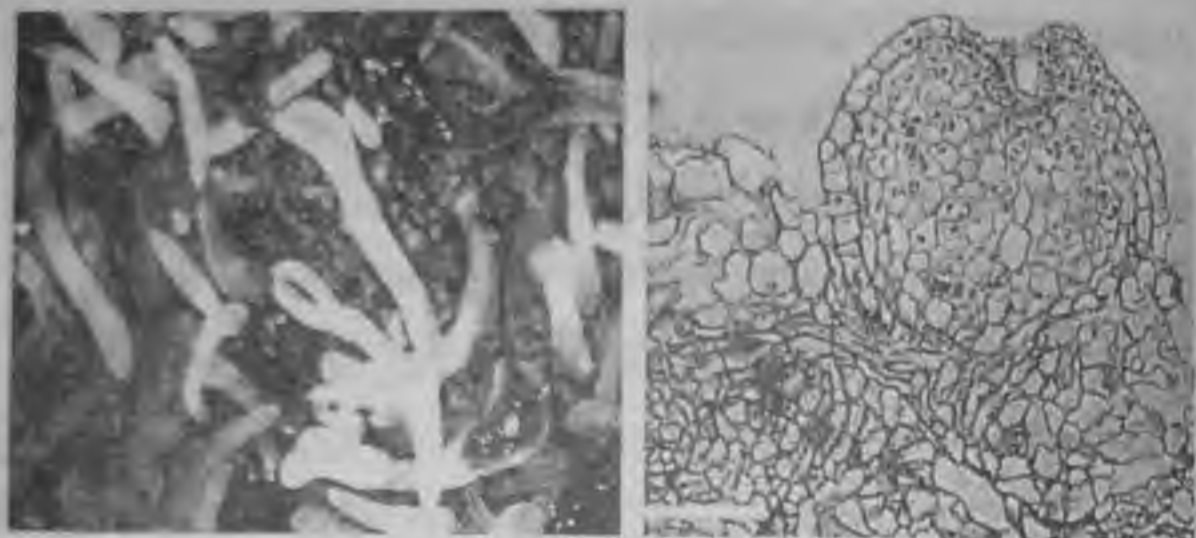
قد تتكون الأجنة الجسدية بطريقة غير مباشرة أى بعد تكوين الكالس حيث تنقسم بعض خلايا النسيج المؤهلة وراثياً وتكون الجنين الجسدى. وتتكون الأجنة الجسدية داخلياً

أو خارجياً على نسيج الكالس، لكن يلاحظ في معظم الحالات أنها تتكون من كالس يشبه البراعم وهو ما يعرف بـ bud-like mass tissue وعلى العكس من تكشف الأفرع يتكشف الجنين من خلية واحدة ولهذا أهمية كبيرة في الإكثار الخضري لضمان عدم وجود كيميرا في النباتات الناتجة. وغالباً ينتج الكالس الذي له قدرة جزئية أو كلية على تكوين الأجنة الجسدية بطريقة غير مباشرة أثناء زراعة أنسجة ميرستيمية مثل الجنين الجنسي، النيوسيلة، البادرات حديثة الإنبات، ومبادئ الأوراق والبراعم الزهرية. ويمكن القول أن الأجزاء القادرة على إنتاج الأجنة الجسدية بطريقة مباشرة قادرة أيضاً على إنتاج الأجنة الجسدية بطريقة غير مباشرة. لكن تقل تلك القدرة في معظم الحالات باستمرار تقسيم وإعادة زراعة الكالس. يلاحظ من الناحية التشريحية أن مجموعة الخلايا التي تنقسم لتكون الجنين تكون منفصلة عن الخلايا المجاورة ويسهل إزالتها من الكالس في البيئة السائلة حيث تطفو على سطح البيئة. وتتميز هذه الخلايا بصغر حجمها وكبر حجم النواة وعدم وجود فجوات عصارية وكثافة السيتوبلازم كما يبين الشكل رقم (٦-١٣). تختلف سرعة ومعدل تكشف الأجنة الجسدية من الكالس باختلاف الأنواع النباتية فقد تتكون بسرعة وبمعدل عالي وربما تحتاج لمدة طويلة من بداية تكوين الكالس حتى تكوينها. وبصورة عامة يصعب الحصول على الأجنة الجسدية من كالس أو المعلق الخلوي للعديد من النباتات ويبين (George & Debregh (2008 أن ذلك يتطلب من الناحية العملية ملاحظة ما يلي:

١. التباين الواسع بين الأنواع أو حتى بين الأصناف التابعة لنفس النوع.
٢. كما هو الحال في تكشف الأجنة الجسدية بطريقة مباشرة فإنه في مرحلة تأسيس المزرعة يضاف إلى البيئة الأوكسينات التي يجب أن تزال كلياً أو يخفض تركيزها إلى الحد الأدنى في المراحل التالية لأن الأوكسينات قد تقلل أو تمنع تكشف الأجنة الجسدية.
٣. يجب أن يهتم بشدة بتركيز السكر في البيئة فقد لا تتكون الأجنة الجسدية إذا كان تركيزه عالياً. كذلك يفضل إضافة النيتروجين في صورة مختزلة كالأمونيا أو في

صورة أحماض أمينية مثل الألانين أو الجلوتامين (Salajova et al., 1999) و
(Wilson et al., 1996)

٤. يعتبر بقاء المزرعة في مرحلة استحثاث تكوين الأجنة من المراحل الحرجة
فطول هذه الفترة قبل إعادة التقسيم والزراعة قد يفقد الخلايا القدرة على تكوين
الأجنة.



شكل ٦-١٣: على اليمين الطور القلبي للأجنة الجسدية المتكثفة من كلس نبات *Echinacea purpurea* بعد ٢١ يوم من الزراعة (المستقيم يمثل ٣٢٠ ميكروميتر) (Choffe et al., 2000). وعلى اليسار تكشف الأجنة الجسدية في معلق الخلايا حيث يلاحظ وجود الأوراق الفلجية والقمم الميرستيمية للجذور.

لوحظ في بعض الحالات تكوين أجسام تعرف بالأبصال الكاذبة pseudobulbils تشبه الأبصال في شكلها المورفولوجي على الكالس ذو القدرة العالية على تكوين الأجنة الجسدية. هذه الأجسام عبارة عن أجنة جسدية في مرحلة النمو globular وتحت الظروف غير المحفزة لاستكمال تطورها إلى أجنة كاملة فإنها تزيد في الحجم وتفقد قدرتها على التطور. ويمكن استخدام هذه الطريقة في الإكثار المعلى للنباتات من المعلق الخلوي لضمان الحصول على عدد كبير نسبياً من النباتات، لكن التركيزات المرتفعة من الأوكسين اللازمة لتكوين المعلق الخلوي مثبطة لتكثف الأجنة الجسدية. هذا بالإضافة إلى إنتاج أجنة مثروثة ذات عدد أكبر من الأوراق القلبية أو بها

التحام مما يعيق إنباتها. ومع هذا فإن هذه الطريقة هي الأنسب من بين طرق الإكثار المعملية الأخرى لبعض النباتات وكثير من الأشجار الخشبية على وجه التحديد مثل نخيل الزيت والبن العربي (Bajaj, 1992). لكن يعيق استعمال هذه الطريقة لإكثار عديد من النباتات بالإضافة إلى صعوبتها عدة أسباب منها:

١. هناك احتمالية عالية لحدوث طفرات.
 ٢. فقد القدرة على تكوين الأجنة باستمرار تقسيم ونقل الكالس.
 ٣. في بعض الحالات تتكون الأجنة لكنها تدخل في دور سكون عميق ويكون من الصعب كسره في بعض النباتات.
- ويجب الإشارة إلى أنه ببدء تكوين الأجنة الجسدية قد تتوالى عملية تكوين الأجنة الجسدية الثانوية فيما يعرف بـ *repetitive embryogenesis*. ويطلق على الأجنة التي تتكون تباعاً *polyembryony* أو *secondary embryo* وذلك حيث تتغيب العوامل التي تمنع تكوين أجنة ثانوية عند تكوين الجنين الجنسي. ويمكن أن تتكون الأجنة الثانوية على محور الجنين الأصلي، وربما من خلايا محددة كالبنشرة (McGranahan et al., 1988). وفي الغالب تكون النباتات الناتجة من تكثف الأجنة الجسدية بطريقة غير مباشرة عادية من الناحية الظاهرية وكذلك التركيب الخلوي، لكن قد تتكون أجنة مشوهة كما سبق القول. ويكثر حدوث ذلك عندما تتكشف الأجنة من كالس أو معلق خلوي تم تنميته لمدة طويلة، فنباتات القمح الخالية من الكلوروفيل والناتجة من الأجنة الجسدية بطريقة غير مباشرة زاد عددها طردياً مع زيادة عمر المزرعة (George & Debergh, 2008).

رابعاً: التكشف غير المباشر في المعلق الخلوي

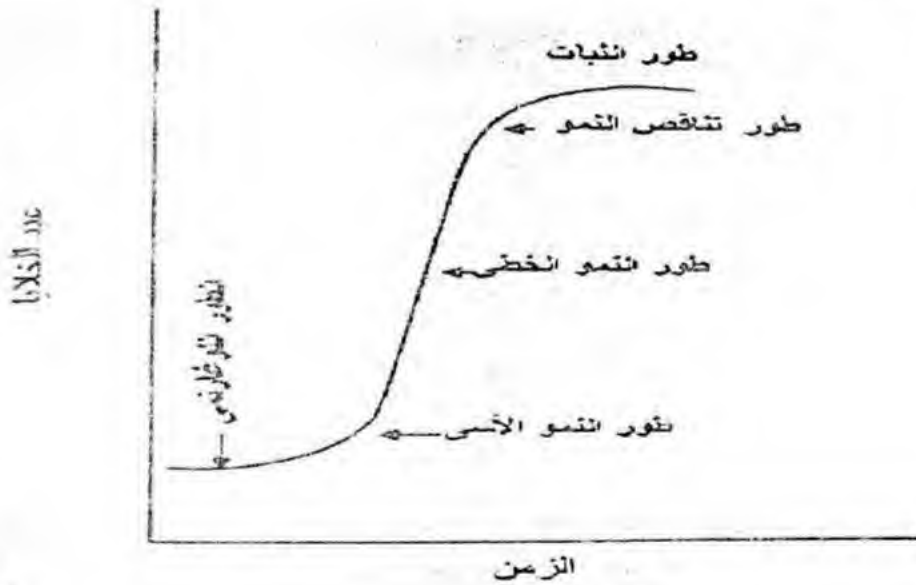
يعتبر الحصول على المعلق الخلوي من الإجراءات الروتينية لبعض معامل الإكثار الدقيق وكل معامل إنتاج المواد الفعالة معملياً. وعند إعداد المعلق الخلوي يجب

التأكد من الكثافة الأولية المستعملة أو على الأقل وجود حد أدنى من نواتج عمليات الأيض لهذه الخلايا والتي يمكن الحصول عليها باستعمال بيئة سبق أن استعملت في نمو خلايا أخرى فيما يعرف بـ *conditioned media*. وقد تبقى الخلايا حية لكن لا تنقسم وتطول فترة الطور اللاجى *Lag* إذا لم يتحقق شرط الحد الأدنى من الكثافة الخلوية أو استعمال بيئة تحتوى على بعض نواتج عمليات البناء الضرورية. وعند إعادة تقسيم الخلايا لا بد من المحافظة على الحد الأدنى للكثافة الخلوية. فإذا كان حجم اللقاح المتاح قليل ويراد استعماله للحصول على حجم كبير من المعلق الخلوى فيتم تنمية اللقاح في حجم قليل من البيئة يزيد تدريجياً حتى يصبح مناسب لتلقيح حجم كبير.

ويتم الحصول على كاس مناسب لتكوين المعلق الخلوى بعد تنميته لمدة ٤-٦ دورات على بيئة شبه صلبة وبشرط التأكد من ثبات معدل النمو والذى يشير إلى تأقلم الكاس مع بيئة الزراعة. يقطع الكاس إلى قطع صغير إذا كان صلب أو يفصل منه أجزاء صغيرة باستعمال الملاقط إذا كان هشاً وتنقل الأجزاء إلى البيئة السائلة التى توضع على جهاز هزاز دائرى. والكاس الهش أفضل لتكوين المعلق الخلوى لأن الكاس الصلب يستغرق فترة أطول لتكوين المعلق الخلوى. ويجب أن يحتوى المعلق القياسى على الخلايا فى صورة فردية وليست فى صورة مجموعات، لذا قد تستخدم أنواع من الأوراق المخروطية مزودة بزوائد داخلية للمساعدة على تفتيت هذه الكتل (*aggregates*). لكن من النادر الحصول على معلق خلوى محتوى على خلايا فردية فقط إذ أنه فى الغالب يحتوى على مجموعات من الخلايا بأقطار تتراوح بين ١٠٠-١٠٠٠ ميكرومتر.

وعند إعادة تقسيم وزراعة المزرعة تزال كتل الخلايا الكبيرة من المعلق بالترشيح بقطعة من القماش المعقم ذات أقطار ٠.١-٠.٥ مم. وتعتبر هذه الخطوة ذات أهمية بالذات فى المراحل الأولى من إعداد المعلق الخلوى. تختلف الطرق المستعملة

لإعادة تقسيم وزراعة المعلق الخلوي على حسب الغرض من المزرعة وكذلك بين المعامل المختلفة وهل تتم إعادة الزراعة للمحافظة على النمو فقط، أم للحصول على سلالة خلوية ثابتة. يمكن أيضاً الحصول على المعلق الخلوي مباشرة من النسيج النباتي والذي يفضل أن يكون أجزاء من البادرة أو حتى البذرة بهرس النسيج يدوياً أو باستخدام جهاز الخفق homogenizer ثم يرشح الناتج لحجز الكتل الكبيرة. بعدها يتم الطرد المركزي للراشح وينقل الراسب إلى البيئة. وتستعمل أيضاً الإنزيمات كالبكتينيز لإهدم مكونات الجدر الخلوية فتتفصل الخلايا عن بعضها. لكن من الناحية العملية يفضل الحصول على مزارع المعلق الخلوي من الكالس. ويبين شكل رقم (٦-١٤) مراحل نمو الخلايا في المعلق الخلوي.



شكل ٦-١٤: مراحل نمو الخلايا في المعلق الخلوي (Stafford & Warren, 1991).

يفضل أن يتم إعادة زراعة المعلق الخلوي في نهاية الطور التضاعفي Exponential من مراحل النمو، ويتم ذلك بنقل حجم مناسب من المعلق الخلوي إلى حجم محدد من البيئة الجديدة وبمثل زمني ثابت. وكما سبق القول الحجم المستعمل كلفاح لا بد أن يحتوي على عدد من الخلايا أعلى من الحد الأدنى الضروري للنمو، فعلى

سبيل المثال يستعمل لقاح بنسبة ١:٥ من المعلق الخلوى لخلايا نباتات *Catharanthus roseus*. ومن الأفضل ترشيح المعلق واستخدام ٥ جم وزن رطب من كتل الخلايا والخلايا لتلقيح ١٠٠ مل من البيئة فى حالة احتواء المعلق الخلوى على كتل من الخلايا ذات أقطار أكبر من ١ مم. ويتحقق الحصول على خلايا ذات تباين قليل بإجراء إعادة الزراعة على فترات قصيرة مثلاً كل ١٤ يوم (Collin & Edward, 1998).

وكما هو فى زراعة الكالس يجب تدوين كافة البيانات على كل دورق من حيث نوع المزرعة، والتاريخ، ومعدل النمو، والحجم المستخدم للزراعة، الخ. ويلاحظ أن الخلايا النباتية أثناء المراحل الأخيرة من دورة الخلية - وعلى العكس من الخلايا البكتيرية- تكون كبيرة الحجم وذات جدار خلوى صلب وفجوات عصارية كبيرة الحجم. هذه المواصفات تجعل الخلايا حساسة للإجهاد التقسيمي Shear stress. وعلى هذا يجب تحريك المعلق الخلوى برفق حتى لا يحدث ضرر للخلايا ويتم ذلك باستعمال هزاز ذو قوة منخفضة ٥٠-٢٠٠ لفة/دقيقة. لكن تكون هذه السرعة المنخفضة سبباً فى عدم الخلط الجيد للمزرعة مما يؤثر فى عمليات الأيض. ومن ثم فإن معدل النمو وحجم اللقاح والحساسية للحركة لا بد وأن تؤخذ فى الاعتبار عند استعمال المعلق الخلوى فى الأغراض المختلفة.

ويمكن تقليل التباين الحادث فى الكالس بدرجة كبيرة باستخدام نظام المعلق الخلوى حيث تكون كل الخلايا منغمسة داخل وسط النمو للتغلب على التدرج الحادث فى مكونات البيئة ونواتج عمليات البناء بين الخلايا والبيئة. لكن لسوء الحظ لا يمكن الحصول على درجة تماثل تام حتى فى المعلق الخلوى حيث أن الخلايا النباتية تميل إلى النمو فى صورة مجموعات وليست خلايا فردية. ورغم أن هناك بعض الطرق تتبع للحصول على معلق خلوى ذو كتل خلايا دقيقة الحجم أى مكون من خلايا فردية فإن المعلق لا يستمر على ذلك لمدة طويلة، وتحتوى اغلب المعلقات الخلوية على كتل صغيرة

من الخلايا. يؤدي احتواء المعلق على كتل كبيرة الحجم من الخلايا إلى عدم التماثل كما هو الحال في زراعة الكالس. وما زال هناك جدل حول نوعية المعلق الذي يفضل استعماله فمن الناحية النظرية المعلق الدقيق يفضل في حالة إنتاج المركبات الثانوية، لكن من الناحية التطبيقية بعض نواتج عمليات البناء لا يتم تخليقها في المعلق الدقيق لكن يرتبط معدل تخليقها بحدوث درجات معينة من التكشف والتي لا تتم إلا في حالة وجود كتل من الخلايا (Stafford & Warren, 1991).

نمو معلق الخلايا

في الظروف العادية تزداد الخلايا النباتية في الحجم ثم ما تلبث أن تنقسم مكونة خليتين لهما القدرة على النمو والانقسام. وإن لم تكن الظروف البيئة مهيأة للنمو والانقسام كارتفاع أو انخفاض الرقم الهيدروجيني للبيئة أو وجود مواد سامة أو تراكم بعض نواتج عمليات الأيض المثبط للنمو فإن الخلية يمكنها المحافظة على حيويتها دون انقسام. ويقاس النمو على مستوى الخلايا الفردية بحدوث دورة النمو الكاملة للخلية أما على مستوى العشيرة الخلوية فإن النمو يمكن أن ينظر إليه في صورة دورة النمو في بعض الأنواع النباتية وتكون الاختلافات الوراثية بين النباتات الناتجة من الكالس أو المعلق الخلوي كبيرة، رغم اعتبار ذلك مشكلة من ناحية الإكثار الخضري. وفي البداية اعتقد أن المعلق الخلوي قد يكون هو الوسيلة الناجحة لإكثار العديد من النباتات خاصة الأشجار التي تكون في الغالب متضاعفة.

إلا أنه بسبب التباين الوراثي العالي لا تعد هذه هي الوسيلة المستهدفة لإكثار الكثير من النباتات، لكن لهذا التباين أهمية كبيرة من وجهة نظر مربى النبات كمصدر للتباين الوراثي، ويمكن بالرجوع إلى (Dix, 1990) معرفة التطبيق العملي لمزارع المعلق الخلوي في إنتاج العديد من الأصناف المقاومة لكثير من الإجهادات البيئية أو الحيوية. ولحسن الحظ يبدو أن النبيتات المستولدة من كالس له قدرة تكشفية عالية تكون

ثابتة وراثياً بدرجة أكبر من تلك الناتجة من كالس له قدرة تكشفية أقل. ويجب الحرص على عدم استعمال أنسجة بها تضاعف داخلي endoreduplication للإكثار. كما يجب تجنب إضافة تركيزات عالية من منظمات النمو المشجعة على التباين الوراثي مثل 2,4-D. وهناك عديد من الطرق التي تستعمل لقياس النمو في المعلق الخلوي ويتوقف استعمال أى منها على طبيعة المعلق والخلايا وهل يحتوى على خلايا فردية غالباً أم على كتل خلوية وكذلك الغرض من زراعة المعلق وهذه الطرق هي:

١. **الوزن الطازج والجاف:** ويعتمد على تقدير كتلة النمو الحيوى بوزن الخلايا الطازجة بحيث توضع ورقة ترشيح مشبعة بالبيئة المستخدمة في الزراعة ومعلومة الوزن فوق قطعة من القماش على قمع Buchner. ثم يقدر وزن الخلايا بعد الترشيح تحت تفريغ. وبغسيل الخلايا فوق ورقة الترشيح وتجفيفها على ٦٠°م يمكن حساب الوزن الجاف للخلايا في حجم معلوم من البيئة. مع الأخذ في الاعتبار أن النمو يتوقف على حجم البيئة المستعملة في نمو المعلق. وبتكرار أخذ عينات من المعلق على فترات ثابتة وهي ثلاثة أيام غالباً وتوقيع النتائج بيانياً يمكن الحصول على منحنى النمو للمعلق. لكن قد تكون النتائج مضللة فتراكم نواتج الأيض كالنشا داخل الخلايا يزيد وزنها لكن لا يمكن اعتبار ذلك زيادة في النمو بصورة مطلقة. لذا ينصح بإجراء قياس آخر كعد للخلايا بجانب قياس الوزن الطازج والجاف

٢. **عدد الخلايا:** يبدأ نمو الخلايا النباتية في المعلق الخلوي بالطور اللاجى ثم الأسى ثم الثبات وينتهى بطور الموت. وتكون الزيادة في عدد الخلايا قليلة لكن بمعدل نشاط أبيضى واضح في الطور اللاجى والذى تتوقف مدته على حجم اللقاح الموجود بالبيئة. ثم تدخل الخلايا في الطور الأسى ويزيد عددها مع زيادة في وزنها الطازج والجاف. ويعبر طور الموت عن الخلل في مكونات البيئة أثناء نمو المزرعة وباستنفاد مكوناتها أو بزيادة تراكم نواتج الأيض السامة. وتحت ظروف النمو المثلى يزيد عدد الخلايا في

المعلق بطريق لوغارتمية ثابتة، فبفرض أن عدد الخلايا الأساسي في المعلق هو "ن" فإن عدد الخلايا في المعلق الخلوي يزيد ليكون "٢ن" ثم "٤ن" ثم "٨ن" وهكذا. ويقدر عدد الخلايا باستخدام المجهر وشريحة العد المستخدمة لعد كرات الدم haemocytometer عقب تكسير الكتل الخلوية في المعلق الخلوي إلى خلايا فردية باستعمال محلول chrominum trioxide أو إنزيم البكتينيز على أن يستخدم محلول منظم للضغط الأسموزي للمحافظة على حجم الخلايا. ويمكن تخزين العينة لمدة تصل إلى أسابيع أو يتم القياس فوراً على أساس نوع المعلق بعد التخفيف بالماء لنصل إلى ٢٠٠ خلية تقريباً لكل ١٠ ميكروليتر.

٣. **حيوية الخلايا:** وذلك بقياس قدرة الغشاء البلازمي على تجميع أو منع دخول بعض الصبغات حيث يقاس التحليل الإنزيمي المائي في الغشاء البلازمي للمركبات ذات الوميض الضوئي مثل fluorescien diacetate والذي ينتج عنه تراكم مركبات fluorescein ذات الوميض الأخضر المميز للخلايا الحية عند تعريضها لأشعة طولها الموجي ٣٦٠ أنجستروم. كذلك فإن استعمال الصبغ Evans blue بصبغة Evans blue يؤدي إلى صبغ الخلية غير الحية فقط. وبذلك يمكن تقدير النسبة المئوية للموتية للحيوية بنسب عدد الخلايا الحية إلى العدد الكلي للخلايا كما يمكن قياس الحيوية بالفحص المجهرى الدقيق على أساس القياس الميكروسكوبى للغشاء الخلوى، النواة، تدفق السيروبلازم. ويمكن استخدام هذا المقياس كدليل للنمو لكن حيوية الخلايا لا تعنى بالضرورة قدرتها على النمو والتكشاف.

٤. **الحجم المعبأ للخلايا Packed cell volume:** وهو يعبر عن الحجم الفعلى للخلايا لكن يجب ألا يحتوى المعلق الخلوى على كتل من الخلايا. يؤخذ حجم معلوم من المعلق الخلوى ويوضع فى أنبوب طرد مركزى مستدق الشكل ومدرج. ويتم الطرد المركزى حتى تمام الترسيب ويقدر حجم الراسب ثم يعبر عن حجم الخلايا المعبأ

منسوبا إلى الحجم الكلى للعينه. ويمكن استخدام نفس العينه لتقدير الوزن الرطب والجاف وعدد الخلايا.

٥. المكونات الحيوية للخلايا Cell biocompounds: باستخدام محتوى الخلية من البروتين أو الأحماض النووية أو التتروجين بالطرق المعروفة. وتمثل هذه المواد نسبة ثابتة من الوزن الجاف.

٦. معامل الانقسام الميتوزى (MI) Mitotic index: يتم الانقسام الميتوزى فى عدة مراحل هى Prophase و Metaphase و Anaphase و (Telophase التمهيدى، والاستوائى، والانفصالى، والنهائى). وفى النهاية تتكون خليتان جديدتان. وبذلك ينتج عنه نمو مباشر فى الكائن بزيادة عدد الخلايا مع المحافظة على عدد الكروموسومات بها وهو أحد مؤشرات النمو الفعلى. ويمكن بسهولة تمييز الخلايا التى دخلت مرحلة الانقسام الميتوزى عن تلك التى فى مرحلة Interphase بالميكروسكوب الضوئى حيث تكون الكروموسومات مندمجة قصيرة الطول ويسهل رؤيتها وعدها بعد صبغها بصبغات تصبغ الحامض النووى. يلاحظ أن زمن الانقسام الميتوزى يكون قصيراً نسبياً مع الدورة الكاملة للخلية ويعبر معامل الانقسام الميتوزى MI عن عدد الخلايا التى توجد فى مرحلة الانقسام منسوبا إلى العدد الكلى من الخلايا وهو مقياس بسيط وذو دلالة هامة فى قياس النمو لكنه يتطلب وقتاً.

٧. تقدير مكونات البيئة والتوصيل الكهربى: يعتبر استنفاد المكونات المختلفة للبيئة من الطرق التى يمكن استخدامها لقياس النمو. لكن يجب الحذر فاستهلاك بعض المواد كالفوسفات قد يفسر بطريقة خاطئة. كما يمكن قياس الذائبات الخلوية التى ترشح من الخلية إلى البيئة والذى يعكس حيوية الغشاء الخلوى ويتم ذلك بقياس التوصيل الكهربى للبيئة وهناك علاقة عكسية بين شدة التوصيل الكهربى والنمو. ويشيع

استخدام هذا المقياس في حالة استعمال المفاعلات الحيوية Bioreactor لإنتاج المواد الفعالة.

خامساً : البذور المصنعة

يعتقد أن الأجنة الجسدية ستكون الطريقة المثلى لتطبيق زراعة الأنسجة في الإكثار التجاري للعديد من الحاصلات الاقتصادية. ويمكن أن تزرع الأجنة الجسدية مباشرة في التربة لكن بنسبة إنبات ونجاح ضعيفة وغير اقتصادية. ومن ثم اتجه العلماء إلى دراسة إمكانية إنتاج أجنة مغلفة يطلق عليها البذور المصنعة artificial seeds أو Synthetic seeds وبذلك يمكن نقلها وتداولها وزراعتها كبذور حادية. وذلك باستعمال مادة مغلفة تغلف الجنين الجسدي وتحفظه من الظروف البيئية غير المناسبة مع إضافة بعض المواد المغذية ومنظمات النمو الضرورية لإنبات الجنين في الحقل، وربما تعامل البذور ببعض المبيدات للحماية من الكائنات الدقيقة بالتربة. لكن يبين Ganapathiet *al.* (2001) أن تلك المواد المضافة بمثابة بديل للاندوسبرم قد تؤثر على معدل بقاء أجنة الموز، وأيضاً كان للسكر تأثير سالب في بيئة الزراعة على حياة العقد الساقية لنباتات Yam المغلفة، لكن بزيادة تركيز السكر في الطبقة المغلفة ثبت تكوين البلورات الثلجية أثناء الحفظ البارد للبذور (Danso & Ford-Lloyd, 2003). وبذلك زاد معدل البقاء.

وعموماً يجب أن تضمن المادة المغلفة حماية الجنين أثناء التخزين والنقل وعمليات الزراعة، لكنها في نفس الوقت لا تعيق نمو الجنين ولا تسبب أي سمية، ومن البديهي أنها لا تشجع نمو الكائنات الدقيقة. ويفضل أن تنتج البذور المصنعة بطريقة تضمن استعمال نفس الآلات التقليدية في عمليات الزراعة، لكن من الأهمية استعمال أجنة متماثلة بقدر الإمكان ويمكن تحديد الأجنة المثلى للتغليف بطريقة بصرية أو بالاعتماد على الكثافة النوعية. ولصعوبة إنتاج الأجنة الجسدية في بعض النباتات قامت العديد من الدراسات باستخدام نفس الفكرة في تغليف العقد الساقية (شكل رقم ٦-١٥) أو القمم

الميرستيمية وربما الكالس، وتكاليف إنتاج البذور المصنعة باستعمال هذه المُستأصلات أقل بكثير عن استعمال الأجنة الجسدية (Rao, 2004). وبالمثل تستخدم تلك البذور للزراعة مباشرة في الحقل أو للحفظ في النتروجين السائل كأحد الطرق الحديثة لحفظ الأصول الوراثية (Engelmann & Engels, 2002 & Razdan, 2002).

وهناك نظامين لإنتاج البذور المصنعة يعتمدان على نفس الفكرة، الطريقة الأولى ويطلق عليها desiccated synthetic seeds حيث يتم نزع الرطوبة من الغلاف المحيط بالجنين. وقد ابتكرت على يد (Kitto & Janick, 1982) ومن بين المواد التي ثبت نجاحها لهذا الغرض polyoxyethylene (Polyox r) التي تذوب في الماء ثم تجفف في الهواء لتكون غشاء رقيق حول الجنين. ويمكن خلط محلول تركيزه 5% من هذه المادة مع حجم مماثل من معلق الأجنة ثم يتم نشر الخليط في قطرات حجمها 0.2 مل على رقائق Teflon في كابينة الزراعة وتترك لتجف حيث تستغرق وقت قد يصل إلى خمس ساعات، ويعرف ذلك بسهولة انفصال البذور في شكل رقائق هشة من على السطح السابق. ويعاد زراعة البذور بعد رفع محتواها المائي بنثرها في بيئة الزراعة مرة أخرى.

أما الطريقة الثانية وتسمى hydrated synthetic seeds وقد ابتكرها (Redenbaugh et al., 1984) وقد حلت محل الطريقة الأولى بشكل واسع. ومن بين المواد التي استعملت لهذا الهدف الجينات الصوديوم حيث يتم خلط محلول 2% من الجينات الصوديوم مع الأجنة الجسدية أو المُستأصلات الأخرى ثم تقطير هذا الخليط في 100 مليلول من نترات الكالسيوم وربما يستعمل كلوريد الكالسيوم بنصف التركيز السابق فيحل أيون الكالسيوم محل الصوديوم ويتكون سريعاً سطح هلامي حول المُستأصل تزيد قوته تدريجاً خلال نصف ساعة. والتحكم في حجم القطرات يمكن قطع طرف الماصات البلاستيكية بطول مناسب لحجم القطرة وحجم المُستأصل. لكن يلاحظ

صعوبة تداول البذور الناتجة وقد تلتصق معاً مع صعوبة وضع الجنين في منتصف البذرة. وقد ابتكرت فعلاً بعض الأجهزة الأوتوماتيكية التي تستخدم لإنتاج كبسولات تحتوي أجنة جنين فردية معدة للزراعة. ومن الأمثلة الناجحة لاستعمال هذه التقنية إنتاج بذور مصنعة لنباتات المشاي بواسطة (Mondal et al, (2004

لكن أشار (Chawla (2000 و Razdan (2002 إلى العديد من الصعوبات التي تحول دون الاستعمال التجاري لهذه الطريقة في الإكثار النقيض وهي:

١. إنتاج البذور المصنعة باستخدام الأجنة الجسدية ذات القدرة على الإنبات لمدة طويلة عملية مكلفة وتحتاج الكثير من الإمكانيات.
٢. ضرورة حفظ البذور من الجفاف أثناء التخزين حتى لا تدخل الأجنة في طور سكون.
٣. يجب حماية الجنين من الكائنات الدقيقة.
٤. انخفاض نسبة إنبات الأجنة من البذور المصنعة ويرجع ذلك إلى عدم التكوين التام للجنين وصعوبة إيقاف النمو أثناء التخزين وعدم ملائمة المواد المخزنة في البذرة أحياناً لإنبات الجنين كالإندوسبرم العادي. ومن ثم يجب إجراء بعض المعاملات للمساعدة في تحسين إنبات البذور المصنعة فبذور الجزر على سبيل المثال تعامل بـ ١٢% سكر أو المعاملة بالبرودة أو حامض ABA بالإضافة لزيادة معدل التقاوى.

أهمية استخدام الأجنة العرضية في برامج تربية النبات

سبق القول أن زراعة الأنسجة تلعب دوراً هاماً في تربية النبات، لكن للأجنة العرضية أهمية خاصة في تربية النبات تتحقق فيما يلي:

١. فرصة العثور على اختلافات وراثية أكبر حيث أن كل نبات ناتج من خلية واحدة على العكس من تكشف الأخطاء. مع عدم وجود كيميرا في النسل الناتج لأن كل خلايا الفرد ناتجة من خلية تحمل نفس الطفرة. وعلى الرغم من هذا فإن التغيرات الوراثية في مزارع الأجنة العرضية أقل من تلك الحادثة عند كشف الأخطاء.
٢. إمكانية إنتاج نباتات خالية من الفيروس في بعض النباتات التي يصعب إكثارها باستعمال مزارع القمم الميرستيمية كبعض أصناف الموالح خاصة تلك التي لا تكون بذور.



شكل ٦-١٥: البذور المصنعة من العقل الساقية لنباتات التين باستعمال ٣% من الجينات الصوديوم (أعلى يمين) ولاحظ عدم انتظام شكل البذور وصعوبة جعل الجنين في الوسط). وفي اليسار بدء الإنبات عقب الزراعة، وفي الأسفل البذور عقب تمام الإنبات مع ملاحظة تكوين الكالسن.

يمكن باستخدام الأجنة العرضية تقصير فترات برامج التربية خاصة في النباتات المتميزة بطول فترة الصبا مثل الأشجار حيث تتجه النباتات الناتجة إلى الإزهار المبكر،

فنباتات ginseng الناتجة من تكشف الأجنة العرضية من الجذور أزهرت مباشرة عقب الإنبات وهو ما وفر ثلاث سنوات من برنامج التربية في الظروف العادية (Ahn et al., 1996). وكذلك عدم الحاجة إلى استخدام بعض الظواهر الوراثية كظاهرة العقم الذكري في الإكثار لإنتاج الهجن.

سادساً: الإكثار باستعمال الأجزاء المخزنة للغذاء

يتم إكثار العديد من نباتات الزينة ومحاصيل الخضر خضرياً باستعمال الأجزاء المخزنة للغذاء كالأبصال، والدرنات، والكورمات، الجذور المتدثرة. فتزرع تلك الأجزاء مباشرة في الحقل فتنبو براعمها وسريعاً ما تتكون الجذور على الأفرع النامية وإذا أمكن إنتاج مثل هذه الأجزاء معملياً فمن الطبيعي أن يتم استخدامها على نطاق تجارى في الإكثار الخضري، فضلاً عن إمكانية استخدامها في حفظ الأصول الوراثية. ولعل لميزة الواضحة في ذلك هي التغلب على مشكلة الأقلمة فالأعضاء المخزنة للغذاء تتحمل بيئات الظروف القاسية. أضف إلى ذلك عدم الحاجة لمرحلة تكوين الجذور معملياً قبل نقل النباتات للبيت المحمي وسهولة عمليات النقل والتخزين والزراعة.

ويمكن للنباتات التي تكون أبصال في ظروف النمو الطبيعية تكوين أبصال في الزراعة المعملية من البراعم الجانبية أو العرضية والتي تتكشف على الأجزاء الورقية أو الحامل الزهري أو حتى من المبايض. وفي بعض الأنواع يجب إزالة البرعم الطرفي لأنه يعيق تكشف البراعم العرضية على قواعد الأوراق المخزنة. وفي بعض الحالات كما في أبصال النرجس والبصل والثوم يجب أن يتضمن الجزء المنزرع جزء من الساق القرصية للبصلة حتى يتسنى تكوين البراعم العرضية ومنها تتكون الأبصال كما هو مبين في الشكل رقم (٦-١٦). وقد أمكن الحصول على كورمات الجلاديولس عند زراعة أجزاء من الكورمة، وبإعادة تقسيم وزراعة الكورمة المتكشفة تكونت كوريمات جديدة. وأمكن كذلك إنتاج كوريمات كالسات الجلاديولس عقب زراعة أجزاء مختلفة منه

(George, 1993) و (Razdan, 2002). أما النباتات المكونة لدرنات كالبطاطس فمن الممكن الحصول على الدرنات واستخدامها في الإكثار التجاري وبالأذات عند إنتاجها من قمم ميرستيمية خالية من الفيروس. وقد أصبح هذا هدف أساسي لبعض برامج إنتاج التقاوى حيث تمتاز الدرنات المكتشفة بتمائلها في الشكل واللون مع تلك الناتجة في الحقل مع سكونها الفسيولوجي لمدة طويلة حتى زراعتها في الحقل، فيمكن بذلك تخزينها مدة طويلة ونقلها من مكان لآخر دون مشكلة وبزراعة الدرنات في الحقل نمت نباتات عادية مشابهة للأصل (Donnelly et al., 2003).



شكل ٦-١: في اليمين تكوين درنات البطاطس في بيئة شبه صلبة وفي اليسار إنبات البراعم عقب كسر السكون.

ولدفع المزارع العملية لهذا المسلك يتم تعديل تركيز السكر ومنظمات النمو وكذلك الضوء، ودرجات الحرارة أثناء الإكثار الدقيق. ولقد انصببت الكثير من الدراسات على إنتاج الدرنات الدقيقة للبطاطس في المعمل كطريقة تجارية لإكثار نباتات البطاطس الناتجة من زراعة القمم الميرستيمية لضمان خلوها من الفيروسات خاصة في البلدان التي تعاني من مشاكل عدم وجود مناطق معزولة لإنتاج بذور البطاطس (Donnelly et al., 2003). ويتم ذلك بزراعة العقل الساقية في بيئة تحتوي على تركيز عالي من السكر

يتراوح بين ٦ و ١٠% مع خفض درجة الحرارة إلى ١٥-١٨ °م وربما يضاف السيتوكينين للبيئة. وباستخدام المفاعلات الحيوية أمكن تقليل تكاليف الإنتاج بشكل كبير.

سابعاً : مزارع المتك وإنتاج النباتات الأحادية

يتم أثناء المراحل الأولى من التكاثر الجنسي اختزال عدد الكروموسومات في المشيج المذكر والمؤنث إلى النصف نتيجة للانقسام الاختزالي meiosis. وإذا أمكن لهذه الخلايا أن تنمو لتعطى نبات فإنه بالطبع سيحتوى على نصف العدد الكروموسومى المميز للنوع. ويحدث ذلك فى الطبيعة بمعدل قليل للغاية لا يزيد عن ٠.٠١% حيث تكون البويضة جنين دون اخصاب فيما يعرف بظاهرة parthenogenesis. ومن النادر أن تتطور نواة حبة اللقاح إلى جنين فى الكيس الجنينى دون أن تشاركها البويضة فى ذلك فيتكون جنين أحادى يحمل صفات النبات الأب. وحتى عام ١٩٦٤ اقتصر إنتاج النباتات الأحادية على بعض المعاملات كقتل نواة حبة اللقاح قبل التلقيح بالتشعيع، أو باستعمال بعض منظمات النمو، وكذلك بدرجات الحرارة المنخفضة. إلا أن هذه الطرق لم تكن فعالة بصورة عملية. وفى سنة ١٩٥٣ أشار Tulecke إلى أن الأنسجة المحتوية على نصف العدد الكروموسومى المميزة للنوع كحبوب لقاح نباتات الداتورة يمكن أن تستخدم كمصدر لزراعة الأنسجة ويتكشف عنها نباتات أحادية العدد الكروموسومى فيما يعرف بـ androgenesis. وتطور استخدام مزارع المتك فى إنتاج النباتات الأحادية تطور سريع ليغطى العديد من العائلات النباتية.

وتكمن فائدة النباتات الأحادية فى استخدامها لإنتاج نباتات ثنائية نقية homozygous فى كثير من المحاصيل خلطية التلقيح فى خطوة واحدة حيث يتم مضاعفة العدد الكروموسومى للنباتات الناتجة باستعمال الكولشيسين. وفى برامج التربية التقليدية يتطلب هذا الأمر إجراء التربية الداخلية inbreeding لعدد كبير من الأجيال يختلف باختلاف النوع، ويعتبر ذلك مهم جداً فى تربية النباتات التى تتميز بطول فترة

الجيل كأشجار الفاكهة ونباتات الغابات وبعض الأبصال. كما يمكن استعمال مزارع المتوك في إنتاج نباتات بها صور مختلفة من التضاعف غير التام ويمكن إكثارها خضرياً. وأمكن فعلاً باستخدام مزارع المتوك إنتاج أصناف محسنة من الدخان والقمح والأرز وغيرها من المحاصيل (Chawla, 2000). كذلك أشار إلى الحصول على هجن فائقة الذكورة (Y) لنباتات *Asparagus* تمتاز بإنتاجيتها العالية وذلك بإنتاج نباتات مذكرة أحادية ثم مضاعفتها بالكولشيدين لإنتاج نبات (YY) ثم تلقيحها مع إناث (XX) لإنتاج هجن ذكور خليط (XY). ويمكن الحصول على النباتات الأحادية في زراعة الأنسجة بثلاثة طرق: (١) زراعة الجاميطات المذكرة، (٢) زراعة خلية البويضة ويطلق على هذه الحالة gynogenesis لكن تعتبر الطريقة الأولى أكثر فاعلية من الثانية والتي يميزها قلة عدد النباتات الالبينو الناتجة في نباتات العائلة النجيلية، وإن كان ذلك يرتبط بالطرز الوراثي للنبات (Reed, 2005)، (٣) إجراء التلقيح الكاذب للجاميطات المؤنثة وقد اتبع ذلك في تلقيح نباتات *Mimulus luteus* بحبوب لقاح من نبات *Torenia fournieri* حيث تطورت البويضة إلى جنين دون حدوث إخصاب ويميز هذه الطريقة الثبات الوراثي العالي للنباتات، وقد استخدمت هذه الطريقة لأول مرة في إنتاج نباتات أحادية من الكيس الجنيني لنباتات الشعير.

لكن يجب الإشارة هنا إلى التباين بين النباتات الأحادية الناتجة من نفس النبات الثنائي، كما هو الحال في التباين بين الجاميطات الناتجة من نفس النبات. وقد حدد Neumman et al. (2009) ثلاث طرز مختلفة لشكل أوراق نباتات الدخان الأحادية الناتجة من نبات واحد عقب مضاعفتها وذلك لوجود بعض الجينات المتنحية المختلفة بالطرز الثلاثة. وكانت الطرز الثلاثة خصبة وحافظت على نفس شكل الأوراق المميز لها لعدة أجيال من التكاثر الجنسي. وقد لوحظت قوة الهجين عند تهجين سلالتين من هذه النباتات مع بعضهما. وسوف نستعرض هذه الطرق بإيجاز شديد وللمزيد من التفصيل

والاختلافات بين الأنواع النباتية راجع (1996) Bohajawni & Razdan وكذلك (2009) Neumann et al.

١. استعمال الجاميطات المذكرة

أو ما يعرف بزراعة المتك أو الخلايا الجرثومية المفصوله منه حيث تتكون النباتات بطريقة androgenesis. والأساس العلمى لهذه العملية هو دفع حبوب اللقاح أو الخلايا الأمية لحبوب اللقاح pollen microspores لتكوين أجنة جسمية أى أنسجة خضرية بدلاً من حبوب لقاح ناضجة. وربما يشاهد تكوين الجذور والأشطاء ثم يحدث ارتباطهما معاً لتكوين النبات الاحادى (Neumann et al., 2009). ويتم هذا التغيير من الحالة الطبيعية التى تؤدى إلى تكوين الجاميطات الجنسية المذكرة إلى تكوين أنسجة خضرية تحت ظروف معينة وفى مرحلة مبكرة من مراحل دورة الخلية حيث يتم وقف نسخ وترجمة الجينات المسنولة عن تكوين الطور الجاميطى وتنشيط نسخ وترجمة الجينات المسنولة عن تكوين الأنسجة الخضرية. فبدلاً من أن تتكون حبوب لقاح تكون الخلية الأمية لحبوب اللقاح أجنة أحادية مباشرة direct regeneration أو تكون أنسجة كالس تتكشف منها أجنة أو أشطاء indirect regeneration. لكن لا تفضل هذه الطريقة للتكشف غير المباشر حيث تتكون بعض نباتات الأحادية من الأنسجة الجنسية ونباتات ثنائية من الأنسجة الجسمية المجاورة لها.

وعموماً قد يكون تكشف الكالس عائقاً أمام تكوين النباتات الأحادية. وتتكون النباتات الأحادية بسرعة أكبر عند زراعة أنسجة المتك متضمنة الخلايا الأمية الذكرية بدلاً من زراعة حبوب اللقاح فقط، فوجود أنسجة المتك يساعد فى انقسام الخلايا بطريقة يعتقد أنها غذائية أو هرمونية. لكن بصورة عامة فإن إمكانية تكوين النباتات الأحادية باستخدام حبوب اللقاح غير كبير وينحصر معظمها فى متك النباتات التابعة للعائلة الباذنجانية أو حبوب اللقاح لبعض نباتات عائلات Cruciferae, Gramineae و Ranunculaceae. لقد تم الحديث سابقاً عن العوامل المؤثرة فى مزارع الأنسجة بصورة

عامة، لكن هناك العديد من العوامل الخاصة بمزارع المتك ويلعب الطرز الوراثي دوراً محورياً في ذلك. ولعل من الضروري استعراض تلك العوامل وإيجاز قبل الخوض في طرق الحصول على نباتات أحادية بطريقتة androgenesis، ولمزيد من التفاصيل يمكن الرجوع إلى (Bhojwani & Razdan (1996).

أ. الحالة الفسيولوجية للنبات الأم وظروف النمو: كقاعدة عامة يجب أخذ البراعم المبكرة والنبات صغير العمر. وهناك بعض الاستثناءات لهذه القاعدة مثلاً كان معدل تكريين النباتات الأحادية من متك نباتات *Brassica rapa* أعلى عند استعمال حبوب لقاح من نباتات تبدو مريضة. وكذلك كانت النباتات المنزرعة في ميعاد متأخر جداً بهدف خفض فترة النمو الخضري أقل من تلك التي زرعت قبلها بشهرين. ويزيد تعريض النباتات للإجهاد كنقص العناصر المغذية، والعطش، والبرودة أو بمعاملة النبات بالمواد التي تؤثر في التطور الطبيعي لحبوب اللقاح كالأوكسينات والإثيريل ومضادات الجبريلين من إنتاج النباتات الأحادية. وإذا كان هناك حاجة لاستمرار الحصول على المتك طول موسم النمو يمنع تكوين الثمار بإزالة الأزهار.

ب. مرحلة تطور حبوب اللقاح: تعتبر المرحلة التطورية التي يتم فيها جمع حبوب اللقاح من العوامل الحاسمة ليس فقط في نجاح هذه العملية بل في تكشف نباتات ثنائية. ويفضل أن تكون حول مرحلة الانقسام الميوزي الأول، بمعنى قبله مباشرة أو أثناءه أو عقب خروج الخلية منه، مع وجود بعض الاختلافات بين الأنواع النباتية. ويمكن بالخبرة استعمال حجم البرعم الزهري كمؤشر على مرحلة تطور حبوب اللقاح، لكن بالطبع يتأثر حجم البرعم بالعديد من ظروف النمو. ومن ثم ينصح بزراعة النباتات المستخدمة كمصدر للمستأصلات النباتية تحت ظروف حرارة وضوء محددة لتحديد الطرز المناسب للبرعم الزهري.

ج. جدار المتك: لجدار المتك أهمية في تطور الأجنة من حبوب اللقاح ويتضح ذلك من رفع نسبة الأجنة المتكونة بزراعة حبوب اللقاح مع مزرعة حاضنة عبارة عن كالس جدار المتك. أو بفصل حبوب اللقاح بعد زراعة المتك لمدة أسبوع في بيئة إنتاج النباتات الأحادية.

د. المعاملة الأولية: تستخدم بعض المعاملات قبل زراعة المتك أو حبوب اللقاح لإستحثات تكوين الأجنة الأحادية، لكن ليس من الضروري اللجوء لتلك المعاملات في بعض الأنواع. وعموماً تشجع العديد من العوامل كالضغط الأسموزي، والحرارة المنخفضة، والإشعاع، ونقص بعض العناصر المغذية وغيرها التي تعتبر بمثابة إجهاد بيئي من تكوين النباتات الأحادية (Maraschin *et al.*, 2005). وتوضح الدراسة السابقة أن تكوين النباتات الأحادية والأجنة الجسدية يمر بثلاثة مراحل هي امتلاك القدرة على تكشف الأجنة الجسدية، ثم بدء الانقسام الخلوي وأخيراً نظام توزيع الخلايا المنقسمة. وتعمل عوامل الإجهاد التي سبق الإشارة إليها وكذلك منظمات النمو على إعادة برمجة عمليات الأيض في الخلية ومنها تثبيط تعبير الجينات المنوط بها التخليق الحيوي للنشا وتثبيط عدد آخر من الجينات المنظمة لتكوين الأجنة الجسدية والتي تسمى BABY BOOM Transcription factor.

وبعد بدء انقسام الخلايا لتكوين الأجنة وتوزيع الخلايا بشكل يضمن تكون الأجنة يلاحظ نشاط الجينات التي تلعب دور في موت الخلية. وتؤثر المعاملات الأولية للمتك قبل الزراعة على نشاط هذه العوامل فعلى سبيل المثال الصدمة الحرارية بتعريض المتك أو حبوب اللقاح لدرجة حرارة منخفضة ٤: ٥° م لفترة تختلف باختلاف النوع النباتي ومرحلة تطور حبوب اللقاح، ثم الزراعة على درجة ٢٥° م. وقد رفعت هذه المعاملة لمدة ٧٢ ساعة نسبة متوك *Nicotiana*

tabacum التي أعطت أجنة أحادية من ٢١% إلى ٥٨% . وفى بعض النباتات مثل *Capsicum* وبعض الطرز الوراثية من القمح والثوفان كانت المعاملة الأولية بدرجة حرارة ٣٠-٣٥ م لفترة ١-٤ يوم مفيدة فى تحفيز تكوين الأجنة الأحادية. وقد أرجع (Pechan *et al.* 1991) ذلك إلى تكوين بعض البروتينات ذات الوزن الجزيئى العالى المنشدلة لتكشف الأجنة الأحادية أثناء الصدمة الحرارية. وبتعريض متك الدخان والداتورا والقمح قبل الزراعة لأشعة جاما بجرعات منخفضة (1-5 Gys) زاد معدل تكوين النباتات الأحادية وكذلك النباتات الخضراء والنباتات الأحادية المتضاعفة بمعدل كبير خاصة فى القمح (Ling *et al.* 1991). والأكثر من ذلك أنها شجعت تكوين الأجنة الأحادية فى البراعم المسنة التى تعدت المرحلة المناسبة للزراعة، وفى طرز لا تستجيب لهذه الظاهرة. ومن المعروف أن هذه الأشعة تعمل على تثبيت النواة والتأثير على محتوى الأنسجة من الأوكسينات والسيتوكينيينات. وقد يكون لبعض منظمات النمو كحمض ABA المضافة للبيئة تأثير إيجابى على تكوين النباتات الأحادية عبر تأثيرها كعوامل مرتبطة بالإجهاد.

هـ. بيئة الزراعة: هناك اختلاف كبير فى مكونات البيئة الصالحة لزراعة المتك بالمقارنة مع زراعة الأعضاء النباتية الأخرى. فعلى العكس من التطور الطبيعى بانقسام الخلايا الجرثومية microspore مرتين فقط فإن تطور الأجنة من حبوب اللقاح يستلزم العديد من الانقسامات لتصبح حبة اللقاح عديدة الخلايا. ويمكن أن يتم ذلك فى الحقل برش النباتات بمركب 2-chloroethylphosphonic acid وبإضافة هذا المركب لبيئة زراعة متك الدخان زاد معدل إنتاج النباتات الأحادية. ويمكن تشجيع انقسام حبة اللقاح بزراعة متك الدخان على بيئة من السكر والأجار فقط مما يشير إلى دور السكر والذى قد يتراوح بين ٢-٦%. لكن لا بد من رفع هذه النسبة حتى ١٢-١٣% لأجناس *Brassica* وربما يرجع ذلك لإبقاء حبوب

اللقاح حبة فترة اطول. وفي القمح يتم استبدال السكر بالمالتوز (Last & Brettell, 1990) أما بالنسبة للمكونات المعدنية للبيئة فيها تباين كبير ومن الصعب التوصية ببيئة محددة، لكن يتباين هذا باختلاف حتى عمر النبات الأم. ومع هذا يبين جدول رقم (٦-٢٣) بعض البيئات التي ثبت نجاحها في بعض الأنواع.

و. كثافة الزراعة: كما هو الحال في المزارع الخلوية تمثل كثافة الزراعة عاملاً أساسياً في مزارع حبوب اللقاح ففي *B. napus* كانت الكثافة المثلى ١٠٠٠٠-٤٠٠٠٠ حبة لقاح/مل من البيئة والحد الأدنى لتحقيق النمو ٣٠٠٠ حبة لقاح. ويشير (Arnison et al. 1990) أن تخفيف الكثافة إلى ١٠٠٠ حبة لقاح/مل بعد يومين من الزراعة لم تؤثر في عدد النباتات الناتجة. وفي *B. oleracea* زاد عدد النباتات الأحادية عند زراعة ١٢-٢٤ متك لكل ٤ مل من بيئة الزراعة مقابل ثلاثة فقط. لكن يبدو أن ذلك يرتبط بالطرز الوراثي حيث تتعارض هذه النتائج مع بعض الملاحظات في *B. napus*.

ي. الضوء: لا يلعب الضوء دوراً هاماً في إنتاج الأجنة الأحادية لبعض النباتات كالدخان والداثورا، لكن ربما يكون لحفظ مزارع حبوب اللقاح في بعض المراحل في الظلام ثم نقلها للضوء فائدة.

كيفية زراعة المتك معملياً

هناك طريقتين أساسيتين للحصول على النسيج المناسب للحصول على نباتات أحادية من زراعة المتك وهما:

أ. عزل الأزهار قبل التفتح وتعيمها سطحياً ثم فصل المتك وزراعته في بيئة شبه صلبة أو سائلة. وقد يتم الحصول على المتك من الأزهار المتفتحة وتعيمه. ويجب

عدم إحداث ضرر للمتك، وربما يفصل الخيط مع المتك لكن قد يسبب وجود ولو جزء بسيط منه تقليل معدل التكشف في بعض النباتات.

جدول ٢٣-٦: مكونات بعض البيئات الأساسية الشائعة الاستعمال في زراعة مزارع المتك وحبوب اللقاح (Bhejwani & Razdan, 1996).

المكون	البيئة (التركيز ملجم/لتر)					
	NN ¹	N ₆ ²	Potato ³	Nitsch ⁴	KA ⁵	NLN ⁶
التركيبات المعدنية						
NH ₄ NO ₃	٧٢٥	-	-	٧٢٥	-	-
KNO ₃	٩٥٠	٢٨٣٠	١٠٠٠	٩٥٠	٢٥٠٠	١٢٥
CaCl ₂ .2H ₂ O	١٦٦	١٦٦	-	١٦٦	٧٥٠	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	١٨٥	١٨٥	١٢٥	١٨٥	٢٥٠	١٢٥
KH ₂ PO ₄	٦٨	٤٠٠	٢٠٠	٦٨	-	١٢٥
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	٤٦٣	١٠٠	٦٨	-	١٢٥
Ca(NC ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	١٠٠	-	-	٥٠٠
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	-	-	-	-	١٥٠	-
KCl	-	-	٢٥	-	-	-
KI	-	٠,٨	-	-	٠,٧٥	-
H ₃ BO ₃	١٠	١,٦	-	-	٣	١٠
MnSO ₄ .4H ₂ O	٢٥	٤,٤	-	-	-	٢٥
MnSO ₄ . H ₂ O	-	-	-	-	١٠	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	١٠	١,٥	-	-	٢	١٠
ZnSO ₄ .4H ₂ O	-	-	-	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	٠,٢٥	-	-	-	٠,٢٥	٠,٢٥
MoO ₃	٠,٠٠١	-	-	-	-	-

تابع جدول ٢٣-٦

CuSO ₄ .5H ₂ O	٠.٠٢٥	-	-	-	٠.٠٢٥	٠.٠٢٥
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	-	-	-	٠.٠٢٥	٠.٠٢٥
CoSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	-	-	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	٢٧.٨	٢٧.٨	-	٢٧.٨	-	٢.٧٨
Na ₂ .EDTA	٣٧.٣-	٣٧.٣	-	٧.٣.	-	٢٧.٣
Sequestrene 330Fe	-	-	-	-	٤٠	-
المركبات العضوية						
Inositol	١٠٠	-	-	٤٥٠.٢	١٠٠	١٠٠
Pyridoxine-HCl	٠.٥	٠.٥	-	-	١	٠.٥
Thiamine-HCl	٠.٥	١	١	-	١٠	٠.٥
Nicotinic acid	٥	٠.٥	-	-	١	٠.٥
Glycine	-	٢	٢	-	-	٢
L-Glutamine	-	-	-	٧٣٠	٨٠٠	٨٠٠
L-Serine	-	-	-	١٠٥	١٠٠	١٠٠
Folic Acid	٥	-	-	-	-	١.٥
Biotin	٠.٥	-	-	-	-	٠.٥
NAA	-	-	-	-	٠.١	٠.٥
2,4-D	-	٢	١٥	-	-	-
BAP	-	-	-	-	-	٠.٠٥
Kinetin	-	٠.٥	٠.٥	-	-	-
Potato extract*	-	-	-	١٠ جم	-	-
Agar%	٠.٨	٠.٨	٠.٦	-	٠.٨	-
Sucrose%	٢	١٥-٢	١٠-٩	٢	١٠	١٣

¹ Nitsch & Nitsch (1969). ² Chu (1978). ³ Chuang et al. (1977). ⁵ Keller and Armstrong (1977). ⁶ Polsoni et al. (1988). * 100 g sliced potato tuber boiled in distilled water for 25-30 min and then strained and filtered.

ب. فصل النورة الزهرية وتنميتها في بيئة سائلة بسيطة التركيب لا تشجع التكثف من الأنسجة الثنائية التركيب، وهي طريقة شائعة الاستعمال في العائلة النجيلية والنباتات ذات الأزهار الصغيرة مثل *Asparagus* و *Brassica* و *Trifolium* لكن يقتصر استعمال هذه الطريقة على العلوّز الورقية المعروفة بقدرتها على تكوين نباتات أحادية. وبعد الزراعة بـ ٨-٢ أسابيع يلاحظ تغير لون المتك الذي استجاب إلى اللون البني ثم يتفجر بسبب الضغط الداخلي الناتج من نمو الأجنة أو كالس حبوب اللقاح. وقد تثبت الأجنة في نفس البيئة أو يلزم نقلها إلى وسط جديد للإنبات والتطور. ويجب التنويه إلى أن النباتات الناتجة من متوك مختلفة أو حتى من نفس المتك متباينة وراثياً لذا يتم تصاحف كل نبات بالعقل السقية على أفراد ليكون عشيرة.

لكن هناك العديد من العيوب حول استعمال مزارع المتك لخصها

(Bohajawni & Razdan, 1996) فيما يلي:

أ. إمكانية إنتاج نباتات ثنائية فقد تنشط الخلايا المكونة لجدار المتك وهو شائع التركيب في التكثف أثناء تكوين النباتات الأحادية. وحتى الآن يصعب التحكم في توجيه الخلايا الأحادية فقط للانقسام دون الثنائية.

ب. التخلص من الأنسجة التي تسيل انتقال المواد المغذية وبقي مكونات البيئة لحبوب اللقاح.

ج. التخلص من المواد السامة والمثبطة الموجودة بالجنين كحامض الأبسيسك في نباتات *Brassica napus* كما أشار Kott et al. (1988) وعلاوة على ذلك ربما تثبيط حبوب اللقاح الأكبر عمراً تكون النباتات الأحادية من الحبوب الأصغر.

د. فرصة تكوين الكيميرا بسبب اختلاط الكالس من أكثر من حبة لقاح.

هـ. صعوبة متابعة تطور الجنين.

وللتغلب على العيوب السابقة ابتكر Kameya & Hinata (1970) تقنية زراعة حبوب لقاح نبات *Brassica oleracea* بدون أنسجة المتك ومن السهل تحديد الطور المناسب من مراحل تطور حبوب اللقاح وفصلها وزراعتها في المرحلة المناسبة لتكوين النباتات الأحادية. ولكنها طريقة صعبة في التطبيق وتحتاج إلى بيئة أكثر تعقيداً، ويتكشف منها عدد قليل من النباتات. ويزيد معدل نجاح زراعة حبوب اللقاح باستعمال مزرعة حاضنة قد تكون ببساطة هي المتك نفسه مع وضع ورقة ترشيح لتفصل بين الاثنين. ويعتبر إضافة الأحماض الأمينية glutamine و l-serine و myo-inositol مهماً في مزارع المتك عموماً وحبوب اللقاح خاصاً.

لكن على الرغم من صعوبة مزارع حبوب اللقاح فإن عدد نباتات *B. napus* الأحادية المكتشف بهذه الطريقة كان ٦٠ ضعف العدد الناتج بالطريقة الأولى Aslam *et al.* (1990). ويفضل في التجارب زراعة المتك كاملاً لمدة ٢: ٧ يوم قبل فصل وزراعة حبوب اللقاح حيث يمثل وجود أنسجة جدار المتك حافزاً لتكوين الأجنة من الحبوب التي تفصل أما بطريقة ميكانيكية أو بالمعالجة بالبرودة في وسط سائل لتطور به ثم تزرع. ولرفع معدل إنتاج النباتات الأحادية بزراعة حبوب اللقاح فصل (Wenzel *et al.* 1975) حبوب لقاح الشعير التي تحول إلى *androgenesis* عن تلك الغير مؤهلة لهذه العملية وذلك بجمع حبوب اللقاح بعد تمزيق المتك وإزالة الأنسجة من المعلق بالتصفية عدة مرات. يلي تلك الطرة المركزي لمدة خمسة دقائق على سرعة 1200g في محلول ٣٠% سكر ثم جمع حبوب اللقاح الموجودة في أعلى المحلول. ويلاحظ وجود فحوات تشير إلى مقترتها على تكوين أجنة أحادية. وقد طورت هذه الطريقة بعد ذلك باستعمال ٥٥% من مادة Percoll مع ٤% سكر. وقد تكون الزيادة الكبيرة في تكوين الأجنة الأحادية في هذه الحالة راجعة لعملية الطرد المركزي في حد ذاتها حيث أعطت نتائج إيجابية في العديد من النباتات. وقد أمكن إنتاج نباتات أحادية باستخدام حبوب اللقاح في عدد من النباتات منها *Penunia*

hybrid و Lycopersicon lycopersicum و Datura innoxia كما بينها
(2000) Chawla و (2002) Razdan.

١. استعمال الجاميطات المؤنثة

يمكن إنتاج النباتات الأحادية بطرق أخرى غير زراعة المتك أو استعمال لحبوب اللقاح في العديد من النباتات مثل الشعير وبنجر السكر ودوار الشمس وغيرها. وذلك من خلايا غير مخصبة من الكيس الجنيني أو المبيض أو البويضات نفسها. وتعتبر هذه الطريقة البديل المناسبة للنبات التي تمتاز بالعقم الذكري. وأشهر هذه الطرق parthenogenesis حيث تتطور خلية البويضة غير المخصبة كنتيجة لتأخير التلقيح، أو بالتلقيح الكاذب عبر استخدام حبة لقاح بها خلل كنتيجة للمعاملة بالأشعة المؤينة كما في نباتات *Cucumis melo*، وأحياناً باستعمال حبة لقاح غريبة قد تكون من نفس النوع لكنها لا تحدث الإخصاب. وقد لوحظت هذه الظاهرة في الهجن النوعية مثل *Solanum tuberosum و Solanum phureja* حيث ينتج نبات $(2n=2x)$ dihaploid والذي يفترض أن يكون رباعي $(2n=4x)$ tetraploid ولكن لكي نضمن حيوية الجنين وعدم حدوث إجهاض لا بد من تكوين الإندوسبرم. وقد تتكشف الأجنة الأحادية بطريقة مباشرة من المستأصلات النباتية أو بعد تكوين الكالس.

وبالمقارنة مع زراعة المتك فإن الأبحاث المتاحة عن طريقة gynogenesis قليلة نسبياً، وذلك لصعوبة تطبيقها على الكثير من النباتات. ومن الناحية التطبيقية تستعمل هذه الطريقة مع النباتات التي لا يحقق فيها زراعة المتك نجاح مناسب كبنجر السكر والبصل. لكن يلاحظ انخفاض عدد النباتات الابينو لنباتات العائلة النجيلية الناتجة بهذه الطريقة. ويلاحظ أن استجابة البويضات يكون أفضل إذا كانت متصلة بالمشيمة. لكن من استعراض (1996) Bohajawni & Razdan يتضح التباين الشديد بين المستأصلات المختلفة على أساس النوع النباتي. وكما هو الحال في زراعة المتك كان لمعاملات

البرودة الأولية تأثير إيجابي في تحفيز إنتاج النباتات الأحادية لنباتات دوار الشمس والأرز. أما بيئة الزراعة فقد تباينت بين الأبحاث المتاحة وأكثرها استعمالاً هو MS و N6 مع إضافة السكر بتركيز يتراوح بين ٣-١٤% (لنباتات القمح والشعير)، وفي العادة تستعمل البيئة شبه الصلبة إلا أن استعمال المزارع السائلة في بدء تكوين المزرعة الأولية لنباتات الأرز كان ناجحاً.

وهناك طريقة أخرى للحصول على النباتات الأحادية وهي طريقة تستعمل في بعض الهجن، فمثلاً عند تهجين *Hordeum vulgare* مع *H. bulbosum* يحدث استبعاد لكروموسومات الأخير عقب الإخصاب ويتكون جنين أحادي من الأول لكن بدون اندوسبرم. ويموت هذا الجنين سريعاً إذا لم يفصل ويزرع في المعمل فيما يعرف بمزارع الأجنة. وعموماً ما زالت هناك بعض المشاكل غير تلك التي تم الإشارة إليها تعيق إنتاج النباتات الأحادية باستعمال زراعة الأنسجة ومنها تكشف نباتات ثنائية ورباعية في ذات الوقت مع تكشف النباتات الأحادية. وصعوبة استعمال حبوب اللقاح لحل هذه المشكلة مع كثير من النباتات.

لعل السمات المميزة للنباتات الأحادية هي قصرها وصغر حجم الأوراق خاصة النصل، وزيادة الثمار الصغيرة بسبب عدم تكوين البذور لأن حجم الثمار يرتبط غالباً بحجم وعدد البذور. وربما يشاهد عدد من الأوراق والأزهار الغير كاملة التكوين، أو اندماج أكثر من ورقة أو زهرة مع بعضهما البعض على العكس من النباتات الثنائية التي تنمو تحت نفس الظروف. وهناك طريقتين أساسيتين للحصول على نباتات ثنائية من تلك الأحادية. وقد اقترح Jensen (1974, 1986) الطريقة الأولى بغمر نباتات الشعير عندما كان عدد أوراقها خمسة أوراق بمحلول ٠.١% من كلوشيسين ويستعمل مركب DMSO بتركيز ٢% و ٠.٢-٠.٥ مل من Tween لإذابة الكلوشيسين. وتستمر المعاملة لمدة خمس ساعات في الضوء وعلى درجة حرارة ٢٠ - ٢٢° م. أما النباتات ذات الفلقتين

الأحادية فيقترح إضافة تركيز ٠.٠٥% من الكلوريسين إلى القمم النامية مباشرة للنباتات الصغيرة باستعمال محقن دقيق (١٠ ميكروايلتر). وفي الدخان يمكن أن تفتح النباتات الثنائية تلقائياً عند زراعة البراعم الورقية للنباتات الأحادية في المعمل وباكثار النباتات الناتجة خضرياً يمكن المحافظة على التركيب الوراثي الأصل للنباتات. لكن تزهر نباتات الدخان الأحادية مبكراً عن تلك التي تم تضاعفها، ويعتقد أنها تحتوي على تركيز أقل من حامض الجبريللك حيث أن معاملتها بالجبريللين أعطى نتائج مشابهة للنباتات المتضاعفة.

ثامناً: التلقيح والإخصاب في أنابيب الاختبار

تتكاثر النباتات الزهرية جنسياً بالبذور والتي تتكون كنهاية طبيعية للعديد من العمليات الحيوية ضمن ما يعرف بالتلقيح والإخصاب المزدوج، ويسبق ذلك مجموعة من العمليات المعقدة لتكوين أعضاء التذكير والتأنيث. وفي الحالات الطبيعية تنمو حبة اللقاح بمجرد سلامة الميسم المعد لاستقبالها مكونة الأنبوبة اللقاحية التي تمر خلال نسيج الميسم والقلم والمبيض وتصل في النهاية إلى الكيس الجنيني حيث يتم الانساج الثنائي بين أحد الأنوية المذكرة والخلية الأمية وبذلك يتكون البنين الزيجوتي ذو التركيب الثنائي المجموعة الكروموسومية. وتتحد النواة الاسبرمية الثانية مع النواتين القطبيتين المتواجدين في وسط الكيس الجنيني لتكوين الاندوسبرم وبهذا يكون الاندوسبرم ثلاثي المجموعة الكروموسومية. ويعتبر النسيج الاندوسبرمي ذو أهمية كبيرة في إمداد الجنين بما يحتاجه من مغذيات، ويسبب عدم ملائمة الاندوسبرم لتغذية الجنين وإجهاضه.

وتتم هذه السلسلة من العمليات البيولوجية بنجاح عندما يكون هناك توافق بين حبوب اللقاح وبين الميسم. وعلى النقيض من ذلك عندما يتم التلقيح في النباتات التي تتميز بوجود ظاهرة عدم التوافق الذاتي أو بين الأنواع والأجناس غير المتوافقة يثبط نمو الأنبوية اللقاحية أو تحدث إعاقة فسيولوجية تمنع حدوث الإخصاب بين الخلايا الاسبرمية

وبين خلايا الكيس الجنيني. يحدث هذا أيضاً في بعض حالات التهجين المتبادل حيث توجد جينات تسبب عدم التوافق بين نمو أنسجة الأم والجنين وتطور نسيج الاندوسبرم وبهذا يحدث إجهاض للجنين الزيجوتى ولا تتكون البذرة.

ونظراً لحدوث الإخصاب المزدوج داخل الكيس الجنيني الموجود داخل عديد من الأنسجة الجسدية فإن آلية هذا الإخصاب ظلت غير معروفة لوقت طويل. وقد أمكن من خلال التقدم في علم زراعة الأنسجة إجراء عمليات التلقيح والإخصاب باستخدام أعضاء نباتية منزرعة على بيئة غذائية للتغلب على عقبات نمو الأنبوبة اللقاحية وإخصاب البويضات طبيعياً. وقد ساعد ذلك خاصة بعد الحصول على طفرات ذات دور في عمليتي التلقيح والإخصاب لنبات الأرابيدوبسيس في فهم آلية حدوث الإخصاب المزدوج على المستوى الجزيئى (Faure, 2001). بالإضافة إلى ذلك فإن التلقيح المعملى يعتبر طريقة فعالة في الحصول على الأجنة الهجين والتي يصعب الحصول عليها بالطرق التقليدية وقد أورد (Razdan, 2002) العشرات من المحاولات التي تمت للحصول على هجن بين أجناس مختلفة ومنها بعض الأمثلة الناجحة للحصول على أجنة هجين. وقد مر تطور التلقيح والإخصاب في مزارع الأنسجة بعدة مراحل كما أوردتها (1987) Pierik و (2001) Faure وهى:

١. حاول Boiso في الأربعينيات من القرن الماضى تحقيق هذا الهدف بإزالة القلم من الزهرة ثم وضع حبوب اللقاح على الجزء العلوى من المبيض لكنه لم يتمكن من الحصول على جنين.

٢. وفي فترة لاحقة أمكن الحصول على بذور ناضجة بحقن مبيض بعض الأزهار بمعلق خلوى يحوى حبوب اللقاح بعد إزالة أعضاء الذكر أو قبل تفتح المنك وانتشار حبوب اللقاح حيث أمكن التغلب على ظاهرة عدم التوافق والتي تعيق عمليات الإخصاب في بعض نباتات العائلة الصليبية. ونظراً لصعوبة اختراق

الخلايا الاسبرمية للكيس الجنيني أحيانا تم تطوير هذه الطريقة بحقن الخلايا الاسبرمية في الكيس الجنيني مباشرة.

٣. في أوائل التسعينات تقدم أسلوب الإخصاب في أنبوبة الاختبار وأمكن فصل البويضة بمفردها من الكيس الجنيني أو فصلها ملتصقة مع الخلايا المساعدة. وأمكن أيضا فصل الخلايا الاسبرمية من حبوب اللقاح وبزراعة هذه التراكيب الخلوية معا في أنبوبة اختبار وباستخدام بيئة تحتوي على ١-١٠ مليمول من كلوريد الكالسيوم ورقم هيدروجيني منخفض للعمل على التصاق الجاميطات معا، وبهذا نجحت أول تجربة لإخصاب الخلايا الجنسية المنفصلة. وبخفض تركيز كلوريد الكالسيوم إلى ١٠٠ ميكرومول تفادى Antoine et al. (2000) حدوث اندماج أكثر من أسبرم مع خلية البويضة.

٤. وفي نفس العقد تمكن Kranz et al. (1991) من استخدام التيار الكهربائي لدمج الجاميطات المذكرة والمؤنثة لنباتات الذرة، وأعقب ذلك الحصول على نبات ذرة خصب. وتطورت هذه الطريقة بعد ذلك لتشمل عديد من الأنواع. ويستهل ناتج الإندماج الكهربائي أو الكيميائي تكون جدار خلوي خلال دقائق بسيطة من الإندماج لمنع إندماج اسبرمي آخر لتكوين ما يعرف بـ polyspermy.

ويوجد العديد من الطرق التي يتم بها إجراء التلقيح والإخصاب وذلك حسب الهدف وهذه الطرق كما ذكرها Razdan (2002) هي:

١. زراعة البويضات المحمولة على المشيمة في بيئة غذائية ثم إجراء تلقيح مباشر باستخدام حبوب اللقاح عندما تصل الأعضاء المؤنثة إلى مرحلة استقبال حبوب اللقاح وهو ما يعرف بـ *in vitro placental pollination* وذلك للتغلب على عدم التوافق في *Petunia* أو لإنتاج نباتات *Mimulus luteus* أحادية عقب التلقيح بحبوب لقاح من نباتات *Torenia fournieri*. وقد نجح Petolino et al. (1990) في الحصول على نباتات ذرة مقاومة للحرارة المرتفعة باستخدام هذه الطريقة

على درجة حرارة ٣٨° م بمعنى أن حبوب اللقاح المقاومة للحرارة المرتفعة فقد تمكنت من الإنبات والإخصاب وكانت النباتات الناتجة تحمل هذه الصفة. ونجح استخدام هذه الطريقة في بعض النباتات الذاتية والخلطية التلقيح، لكن تحتاج هذه الطريقة إلى مهارة عالية وخبرة واسعة للحصول على نتائج جيدة.

٢. زراعة المبيض كاملاً بعد إزالة القلم ويتم التلقيح داخل المبيض باستخدام إبرة دقيقة. وكلما زاد عدد البويضات في المبيض ارتفع معدل نجاح هذه الطريقة، حيث يتيح العدد الكبير الفرصة في وجود عدد من البويضات التي لم تصاب أثناء عزل المبيض. كما يجب أن تتمتع حبوب اللقاح بحيوية عالية وقدرة على الإنبات وربما تعامل المبايض بمحلول كلوريد الكالسيوم تركيزه ١% قبل يوم من التلقيح لتشجيع نمو أنبوب اللقاح (Zenkteler, 1970).

٣. إذا كان الهدف هو متابعة عملية الإخصاب وتطور الجنين في أنبوبة الاختبار فيجرب فصل زراعة البويضات في بيئة سائلة قبل الإخصاب الطبيعي ثم التلقيح بحبوب اللقاح. ويعيق وجود غشاء مائي حول البويضة نمو أنبوبة اللقاح، ويمكن التخلص منه باستعمال ورق ترشيح وعند نجاح التلقيح يشاهد نمو الأنبوبة اللقاحية في مراحل مبكرة ويتم الإخصاب بين الجاميطات المذكرة والمؤنثة. لكن يصعب متابعة مراحل التطور المبكرة نظراً لصغر حجم حبوب اللقاح وكذلك وجود طبقات عديدة من الأنسجة التي تحيط بالكيس الجنيني فيلزم إعداد عينات في مراحل التطور المختلفة للفحص الميكروكوبى.

٤. ابتكر (Nitsch 1951) في بداية الخمسينيات طريقة تعتمد على فصل المبيض من أزهار Cucums و Lycopersicom عقب التلقيح وزراعتها في بيئة مغذية بغرض الحصول على بذور لكنها كانت أصغر حجماً من تلك الطبيعية. وكان لإضافة فيتامين ب و لبن جوز الهند وهرمون IAA تأثير واضح على حجم الثمار

والبذور المتكونة في القوارير. وفي بعض النباتات أحادية الفلقة يعتبر وجود الغلاف الزهري من العوامل الضرورية لنمو الجنين والثمار.

هـ. تمكن (Kranz & Lorz 1993) من عزل الجاميطات المذكرة عقب إنبات حبوب اللقاح باستعمال الجهد الأسموزي، وكذلك الجاميطات المؤنثة من داخل الكيس الجنيني والتي تحتوى على خلية البويضة والنواتان المساعدتان ويتم ذلك باستعمال بعض الإنزيمات التى تحال الجدار الخلوى أو بطريقة ميكانيكية. وتحت المجهر أمكن دمج الجاميطه المذكرة بالمؤنثة بطريقة كهربائية أو باستعمال بعض الكيماريات مثل PEG وبالفعل تكون الزيجوت وانقسم وتكون نبات ذرة خصب. لكن هذه الطريقة معقدة وتحتاج لدقة عالية جداً (Bohajawni & Razdan, 1996).

حاول العلماء فهم المتطلبات المختلفة والظروف المحيطة والتي تناسب عمليات الإخصاب وتكوين الجنين والبذور فى أنابيب الاختبار. وركزت هذه الدراسات على المحاصيل الاقتصادية كالذرة والقمح. اشتملت هذه الأبحاث على دراسة التركيب الوراثى وحيوية ونوعية حبوب اللقاح وكذلك المراحل التطورية المختلفة للأعضاء المؤنثة وتحديد أفضل الظروف التى تتوافق مع حدوث نجاح التلقيح والإخصاب داخل أنبوبة الاختبار. ويعتبر تركيب البيئة المناسب للمبايض صغيرة العمر من العقبات التى تعيق استخدام هذه الطريقة.

وبالرغم مما حققته هذه الطريقة من نجاح إلا أن هناك بعض العقبات التى تعيق تطور الجنين فى أنبوبة الاختبار عقب نجاح التلقيح والإخصاب فقد يحدث انقسام ميتوزى زيجوت وينتج جنين مكوناً من العديد من الخلايا ولكن بعدها يفقد الجنين القدرة على انقسام والتطور، ويمثل ذلك مشكلة كبيرة حيث يصعب الحصول على النبات الهجين. ذلك فإن هناك بعض المشاكل التى ترتبط بانفجار الأنبوبة اللقاحية وفقد الحيوية أو

انحلال الببضة وعدم تطور الاندوسبرم. وبصورة عامة بعد حدوث التلقيح فى أنبوبة الاختبار يلاحظ زيادة واضحة فى حجم المبيض. وقد يكون السبب المباشر فى انتفاخ المبيض هو زيادة حجم الاندوسبرم وليس الجنين، ففى بعض الحالات يفشل انقسام الجنين ولكن يستمر الاندوسبرم فى الانقسام والزيادة فى الحجم ويحدث ذلك فى التلقيح والإخصاب بين الأنواع النباتية المتباعدة وراثياً. يدل هذا على أن حدوث الإخصاب ليس أمراً أساسياً فى تطور الاندوسبرم فقد يحدث استحثاث لتكوين الاندوسبرم نتيجة لدخول أنبوبة اللقاح إلى الكيس الجنينى. لذا لابد من التأكد من نجاح التلقيح والإخصاب حيث يجرى فصل بعض البويضات عقب إجراء التلقيح بفترات متتالية ثم تفحص ميكروسكوبياً وبالتالي يمكن دراسة مراحل تطور الاندوسبرم والجنين (Pierik, 1987) و (Razdan, 2002).

يتم حفظ الأعضاء المؤنثة بعد التلقيح على حرارة ٢٥ : ٢٧°م وذلك لتنشيط نمو الجنين بعد الإخصاب. ولا تحتاج المراحل المبكرة لنمو الجنين إلى مدى محدد من الضوء والحرارة حيث أن الجنين يمكن أن ينمو متصلاً بالمشيمة على حرارة الغرفة. أما فى المراحل المتقدمة من نمو الجنين فيجب توفير الحرارة المناسبة والملائمة لاستمرار نمو الجنين. وليس هناك فرق فى استخدام هذه الطريقة لإجراء تلقيح ذاتى أو تلقيح خلطى لكن عند التلقيح الذاتى نجد أن الجنين يظل متصلاً بالمشيمة إلى أن تصل البذرة إلى مرحلة النضج، أما فى حالة إجراء التلقيح الخلطى فيفضل فصل الجنين عن المشيمة بعد ١٠ أيام من إتمام التلقيح والإخصاب وعند توقف النمو ينقل الجنين إلى بيئة مغذية سائلة. وعندما يصبح الجنين أكثر نضجاً وتطوراً ينقل إلى بيئة صلبة. وفى بعض الحالات أمكن زراعة المبيض كاملاً بعد عملية التلقيح والإخصاب وبهذه الطريقة تطورت بعض ثمار الطماطم والخيار فى البيئة. وقد احتوت الثمار المتكونة على بذور، إلا أن حجم الثمار كان صغيراً بالمقارنة بحجم الثمار التى تطورت تحت الظروف العادية. وأدى إضافة فيتامين ب إلى البيئة المغذية لتحسين حجم الثمار المتكونة وزيادة حيوية البذور الناتجة. أيضاً

اتضح أن إضافة بعض منظمات النمو النباتية مثل IAA أو مستخلص لبن جوز الهند يزيد من حجم الثمار.

تاسعاً: زراعة الأجنة

في الجزء السابق تمت الإشارة إلى كيفية حدوث عمليتي التلقيح والإخصاب في مزارع القوارير. أما زراعة الأجنة فتعنى عزل الجنين التام النضج أو غير تام النضج الناتج عقب التلقيح الطبيعي أو المعملّي وزراعته على بيئة مغذية للحصول على نبات كامل. وكانت بداية هذه الوسيلة في ١٩٠٤ بعزل الجنين الجنسي من نباتات *Cochleria* و *Raphanus* وزراعته على بيئة مغذية ليكون بادرة. ثم نجح Laibach في عام ١٩٢٩ من انقاذ الجنين الناتج من تلقيح *Linum perenne x L. austrianum* بزراعته معملياً. وعموماً تهدف زراعة الأجنة معملياً إلى:

١. التغلب على مشاكل إجهاض الأجنة عقب الإخصاب.
٢. الحصول على نباتات كاملة تحت ظروف يتم التحكم فيها لدراسة مراحل تطور الجنين وتحويل الخلية الزيجوتية إلى جنين خلال العديد من العمليات المعقدة والتي تضم الانقسام الخلوي وتمدد الخلايا وفي النهاية تشكيل وتميز الأعضاء والتي تعتمد على التفاعل بين الخلايا المتكونة ونسيج الاندوسبرم.
٣. إنتاج هجن لا يمكن أو يصعب إنتاجها طبيعياً أو بالطرق التقليدية في تربية النبات، أي أن زراعة الأجنة جزء هام ومكمل لعمليات التلقيح والإخصاب داخل أنابيب الاختبار.

وزراعة الأجنة خاصة غير تامة النضج عملية معقدة تتطلب مهارة عالية في فصل الجنين من المبيض بدون حدوث ضرر لأنسجته وزراعته في نوع مناسب من البيئات المغذية. ولمزيد من التفاصيل حول فصل أجنة نباتات مختلفة يرجع إلى (Pierik, 1987) و (Bohajawni & Razdan, 1996) و (Razdan, 2002) و (Reed, 2005). وعموماً هناك طريقتان تستعملان لزراعة الأجنة هما:

زراعة الأجنة الناضجة

تمتاز زراعة الأجنة الناضجة بنسبة عالية من النجاح لعدم حاجة الجنين إلى بيئات غذائية معقدة. وقد أجريت أول تجربة لزراعة جنين على بيئة غذائية بواسطة Hanning في بداية التسعينيات من القرن الماضي حيث فصل الجنين الناضج من بذور بعض نباتات العائلة الصليبية ثم زراعته على بيئة بسيطة محتوية على بعض الأملاح المعدنية والسكروروز. وساعد استخدام البيئات الحالية معقدة التركيب والمضاف إليها السكروروز إلى نمو بدايات الجذور والأفرع النباتية ومكنت هذه الطرق من دراسة احتياجات الأجنة وكذلك عمليات التمثيل الحيوى. وأصبح معروفاً أن الجنين المنفصل يمكنه النمو والاستفادة من النتروجين فى صورة أملاح النترات والأمونيوم والجلوتامين كمصدر للنتروجين. وبالطبع هناك تباين بين أجنة الأنواع النباتية المختلفة فى استجابتها لمنظمات النمو. ويعتبر نسيج الاندوسبرم مصدر لبعض الهرمونات التى تنشط نمو الجنين فجنين بذور القلقاس ينمو فى حالة وجود الاندوسبرم بما يحتويه من طبقة الأليرون. وقد تم زراعة ونمو بعض الأجنة المفصولة عن نسيج الاندوسبرم على بيئة مضاف إليها أوكسينات وسيتوكينينات ويدل هذا على أن الاندوسبرم يمد الجنين بالهرمونات اللازمة للنمو.

زراعة الأجنة غير الناضجة

فى كثير من الأنواع النباتية يدخل الجنين عقب وصوله طور النضج الكامل فى مرحلة السكون. وتتميز مرحلة السكون بانخفاض العمليات الحيوية وتستغرق هذه المرحلة من عدة أيام إلى عدة سنوات وذلك حسب النوع النباتى والظروف البيئية. ويمكن منع طور السكون الذى يحدث بتمام النضج بفصل الجنين غير الناضج وزراعته على بيئة مغذية حيث يستمر فى النمو ويطلق على ذلك النمو المبكر للجنين. وقد أمكن فى بداية التسعينات تثبيط النمو المبكر للجنين باستخدام حامض الابسيسك والذى يتكون خلال

مراحل التطور المختلفة. وفي بعض الأنواع يلاحظ إنبات الجنين والبذرة مازالت على النبات وترجع هذه الظاهرة إلى انخفاض تركيز حامض الأبسيسك في البذرة أو عدم حساسية الجنين لوجود هذه المادة المثبطة للنمو. وقد اتضح أن الدور الذي يلعبه حامض الأبسيسك يرجع إلى عمله كمنظم لعمليات التمثيل الحيوى خلال تكون الجنين إذ يقوم بالتأثير على المحتوى المائى بالخلايا المكونة للجنين مما يقلل من نسبة الماء وبالتالي يدخل الجنين فى حالة السكون أما فى حالة انخفاض تركيزه ترتفع نسبة الماء وتحدث ظاهرة النمو المبكر.

كما يعتبر وجود أنسجة الأندوسبرم من العوامل التى تساعد فى نجاح زراعة الأجنة الغير ناضجة بشكل جيد بالمقارنة مع البينات التقليدية. وينصح باستخدام اندوسبرم اكبر من عمر الجنين بحوالى خمسة أيام. وليس من الضرورى أن يكون الأندوسبرم من أحد الأباء وبهذه الطريقة تمكن Williams & De Lautour (1980) من زيادة عدد الأجنة الهجين التى أمكن الحصول عليها من تهجين عدة أجناس من الأعلاف البقولية بالمقارنة مع زراعتها فى بيئة مغذية. وتنقسم الاحتياجات الغذائية للأجنة غير المكتملة إلى مرحلتين الأولى خليطة الحاجة الغذائية heterotrophic حيث يحصل الجنين على احتياجاته من الأندوسبرم وأنسجة الأم. وبعد وصول الجنين إلى مرحلة متقدمة من النمو فإنه يصبح قادراً على تكوين احتياجاته الغذائية بنفسه لكن لا يزال الانتقال بين المرحلتين من المراحل الحرجة فى زراعة الأجنة. وعليه تختلف مكونات البيئة فى كلتا المرحلتين وربما يلزم نقل الجنين من بيئة إلى أخرى لإكمال النمو. وقد ابتكر Ko et al. (1983) طريقة تمكن الجنين من النمو والتطور فى بيئة واحدة دون الحاجة إلى نقله لوسط جديد. وتطلب نمو جنين Datura إضافة لبن جوز الهند للبيئة وإلا تحول الجنين إلى كالس (Razdan, 2002). وغالباً يتم زراعة الأجنة على درجة حرارة ٢٥-٣٠ °م وإن كان Reed (2005) يرى أن تتماثل درجة الحرارة مع تلك فى الظروف الطبيعية فالنباتات الشتوية تحتاج إلى درجة منخفضة. وربما يكون من الضرورى خفض درجات الحرارة

للنباتات المعروفة بطور السكون للأجنة. ومن التطبيقات العملية لزراعة الأجنة (Razdan, 2002) ما يلي:

١. التغلب على مثبطات النمو الموجودة بالنبور والتي تمنع الإنبات اصطناعي كما في بذور العديد من النباتات مثل *Rosa* و *Iris* وبعض أنواع الصنوبر. وبذلك يمكن تقصير دورة التربية وإنتاج أكثر من جيل في نفس العام، فمثلاً يمكن تقصير دورة حياة نباتات الأيرس من ثلاث سنوات إلى أقل من سنة.
٢. إنبات بذور النباتات الجبرية التطفل كالهالوك.
٣. إنتاج النباتات الأحادية بعد التهجين بين أنواع مختلفة، فبعد تهجين *Hordeum vulgare* مع *H. bulbosum* يلاحظ حدوث استبعاد لكرموسومات *H. bulbosum* ويموت الزيجوت، لكن بفصل الجنين وزراعته يتم الحصول على نباتات أحادية من *Hordeum vulgare*.
٤. إنتاج نباتات ثلاثية من تهجين أباء ثنائية مع رباعية.
٥. منع إجهاض الأجنة في النباتات المبكرة النضج حيث يقف إمداد الجنين بالمواد الغذائية في النباتات ذات النواة الحجرية كالخوخ، المشمش، البرقوق مبكراً عقب نضج الثمار وانفصالها من النبات الأم، مما يعنى موت الجنين والذي يمكن المحافظة عليه بفصله وزراعته معملياً.
٦. منع إجهاض الأجنة بسبب عدم التوافق.

عاشراً: عزل وزراعة البروتوبلاست

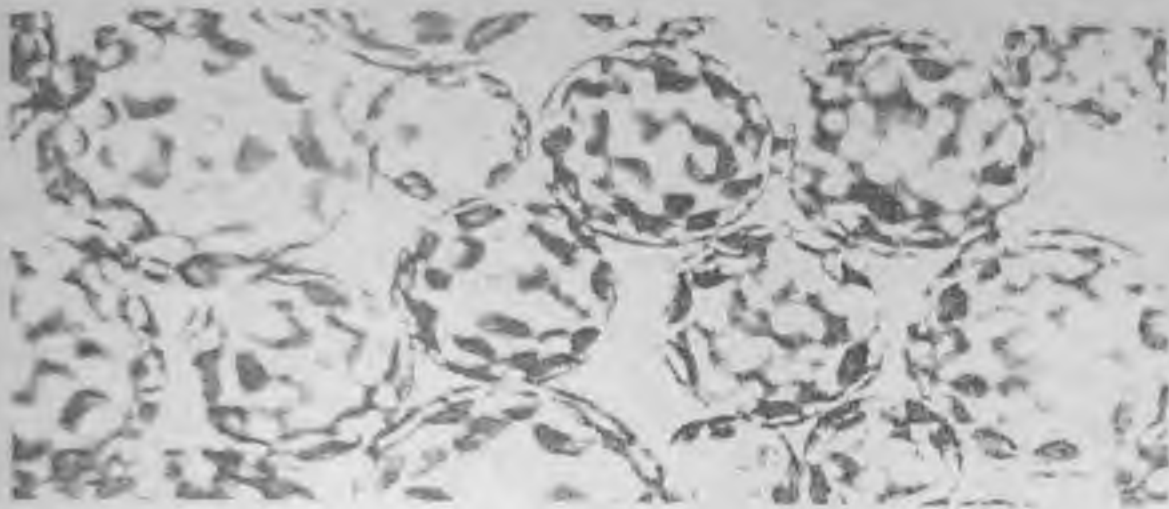
تتميز الخلية النباتية بوجود جدار سميك صلب يحيط بالخلية من الخارج يعرف بالجدار الخلوي. ويعتبر هذا الجدار العامل الأساسي في تحديد شكل الخلية وتكوين الدعامة الأساسية للنبات، بالإضافة لكونه خط الحماية الأول ضد العوامل الخارجية، ودوره في تكوين الأنسجة والاتصال بين الخلايا وبعضها البعض. وبالرغم من هذا الدور فإنه يعتبر من وجهة نظر علماء الأحياء عائقاً لإحداث اتصال الخلايا للحصول على هجن جسمية. ومن ثم اتجهوا إلى محاولة إزالة هذا الجدار لإكتمال عملية اندماج البروتوبلاست. وكانت بداية هذا النجاح عندما استطاع (Cocking 1960) في استخلاص أنزيم

Cellulase من فطر *Myrothecium verrucaria*. حيث أمكن باستخدام هذا الإنزيم هدم السيلولوز المكون للجدار الخلوى وتحرير البروتوبلاست أى الخلية منزوعة الجدار الخلوى فى صورة حية من القمم النامية لجذور الطماطم. وبعد نجاح المحاولات الأولى فى عزل البروتوبلاست تم إحداث تطور للتقنية المستعملة لعزل البروتوبلاست وزراعته فى وسط مغذى للحصول على نباتات كاملة وكان لذلك دوراً هاماً فى التحسين النباتى للعديد من الأنواع النباتية. وتجدر الإشارة إلى أن (1971). Takebe *et al* حصول على أول نبات دخان كامل من زراعة البروتوبلاست. ومن أهم التطبيقات العملية لتقنية عزل وزراعة البروتوبلاست استخدامها فى برامج تربية النباتات ذات العقم الذكرى السيتوبلازمى. ومن المراجع الجيدة التى تعالج هذا الموضوع (1987) Pierik و (1996) Bhojwani and Razdan و (2005) Veilleux *et al* و (2008) George التى تم الاستعانة بها فى كتابة هذا الجزء.

طبيعة البروتوبلاست

يعتبر البروتوبلاست خلية عارية منزوعة الجدار الخلوى كما فى الشكل رقم (١٦-٦) أى أنه عبارة عن سيتوبلازم محاط بغشاء خلوى فقط ذو شحنات سالبة ويسبب ذلك تنافر بين البروتوبلاست وبعضه البعض، وكذلك بينه وبين الجزئيات الأخرى التى تحمل نفس الشحنة والموجودة فى الوسط المحيط. ولو تم تحرير البروتوبلاست فى ماء أو وسط غذائى ذو ضغط اسموزى عادى فإن البروتوبلاست سوف ينفجر بسرعة لامتصاصه الماء ولعدم وجود الضغط الجدارى الذى يضاد الضغط الاسموزى للسيتوبلازم. ومن ثم يتبين ضرورة استعمال محلول ذو ضغط اسموزى مرتفع ومناسب أى ذو قيمة سالبة عالية أثناء فصل البروتوبلاست. وإذا كان الضغط الاسموزى لمحلول الفصل منخفض جداً يلاحظ بلزمة البروتوبلاست بخروج الماء إلى الوسط الخارجى بسبب ذلك ضرر شديد للبروتوبلاست. وبمجرد إزالة الجدار الخلوى يتحرر

البروتوبلاست في وسط الفصل المناسب من الناحية الأسطوانية بشكل كروي. وتُشاهد بروزات كروية على السطح الخارجى للغشاء البروتوبلاستى بسبب وجود فجوات في الغشاء، وتعتبر هذه البروزات مناطق ضعف في الطبقة الثنائية اللييدات المكونة للغشاء الخارجى. ويجب عدم اعتبار هذه الزوائد التى قد توجد على السطح الخارجى للبروتوبلاست دليل على بداية حدوث انقسام.



شكل ٦-١٦: البروتوبلاست المعزول من خلايا الأوراق.

بالطبع الغشاء البلازمى غير قوى التركيب مقارنة بالجدار الخلوى ولذا يعتبر البروتوبلاست شديد الحساسية للظروف الخارجية والحركة الميكانيكية. وتسبب هذه العوامل ضرر شديد أو انفجار أو على الأقل فقد الحيوية والقدرة على التكشف. وعلى هذا يجب توخى الحذر الشديد أثناء فصل وزراعة البروتوبلاست. وبصورة عامة فإن البروتوبلاست الكبير الحجم مثل ذلك المعزول من خلايا الميزوفيل أشد حساسية للظروف المحيطة عن البروتوبلاست الصغير الحجم المعزول من المعلق الخلوى، وينبغى أن يشار إلى وجود عوامل أخرى غير الحجم تؤثر في حساسية وحيوية البروتوبلاست.

عزل البروتوبلاست

استهلت هذه الطريقة مبكراً على يد Klercker فى عام ١٨٩٢ حيث عزل البروتوبلاست بعد تقطيع الأنسجة إلى أجزاء صغيرة ووضعها فى محلول مناسب يعمل على بلزمة الخلايا فتحرر البروتوبلاست من تلك التى قطع جدارها الخلوى بدون اصابة الغشاء السيتوبلازمى. لكن حتى الآن تعتبر الطرق الميكانيكية غير جيدة لأنها تنتج محصول قليل من البروتوبلاست. أما تعتبر عملية فصل البروتوبلاست من العمليات البسيطة من الناحية النظرية بواسطة بعض الأنزيمات المحللة للسكريات العديدة المكونة للجدار الخلوى. ويستقبل البروتوبلاست المحرر فى وسط ذو ضغط اسموزى مرتفع لمنع انفجاره. لكن من الناحية العملية هناك العديد من العوامل التى تؤثر فى محصول البروتوبلاست وحيويته وتكشفه بعد ذلك، ومن هذه العوامل ما يتعلق بالنسيج النباتى أو المعلق الخلوى المستعمل كمصدر للبروتوبلاست والإنزيمات المستخدمة لهدم الجدار الخلوى وبعض الظروف البيئية الأخرى.

لذا فإنه لابد من إجراء عدة تجارب لمعرفة هذه العوامل للوصول إلى التوليفة المثلى لنجاح عزل وزراعة البروتوبلاست. فقد تكون الظروف المناسبة لعزل بروتوبلاست صنف ما غير مناسبة لصنف آخر من نفس النوع النباتى. وفى معظم التجارب يكون المصدر الشائع لفصل البروتوبلاست هو الأوراق، إذ تحتوى أنسجة الورقة غالباً على بروتوبلاست ذو قدرة عالية على الانقسام بعد العزل والزراعة. ويفضل أن يتم الحصول على الأوراق من نباتات نامية فى القوارير أو البيت المحمى للتحكم فى درجات الحرارة والضوء والعناصر المغذية. وينجح استخدام أنسجة الأوراق صغيرة العمر حديثة الإنبساط مع العديد من النباتات ذات الفلقتين، لكن قد تكون هناك صعوبة فى حالة نوات الفلقة الواحدة وعندها يمكن استخدام مزارع المعلق الخلوى. وفى بعض الحالات كان البروتوبلاست المعزول من أجراء نباتية أخرى ذو قدرة أعلى على

الانقسام وأكثر ملائمة لأغراض معينة كاستعمال بروتوبلاست حبوب اللقاح للحصول على نباتات أحادية. وتحتاج الأنسجة المختارة إلى تركيزات أعلى من إنزيمات الهضم أو مدة أطول مقارنة باستعمال أنسجة الورقة. وقد تكون هذه المعاملات ذات تأثير سلبي على محصول البروتوبلاست وحيويته.

قد تشارك معظم الخلايا الموجودة في النسيج المستعمل في محصول البروتوبلاست المعزول ولذا يفضل استعمال نسيج يحتوى على نوع واحد من الخلايا كحبوب لقاح للحد من عدم تجانس البروتوبلاست الناتج. أو توفير الظروف المثلى لعزل بروتوبلاست نوع معين من الخلايا، فعل سبيل المثال يمكن فصل بروتوبلاست الخلايا الحارسة باستعمال تركيز مخفف جداً من الإنزيمات بالمقارنة مع باقى أنسجة الورقة. هذا وقد يحدث انتخاب تلقائى لبعض البروتوبلاست بسبب الاختلاف فى القدرة على تحرر بروتوبلاست بعض الخلايا دون غيرها، مثلاً من الصعب تحرر بروتوبلاست خلايا بشرة الأوراق. ويمكن بعد الفصل انتخاب بروتوبلاست نوع محدد من الخلايا إذا أمكن تميزه بصفة معينة كوجود صبغة معينة. وتقسم مراحل فصل البروتوبلاست إلى الخطوات التالية:

١. إعداد إنزيمات هضم الجدار الخلوى

يتكون الجدار الخلوى غالباً من ثلاث مواد عديدة التسكر هى β 1-cellulose, glucan, hemicllulose 4 وكذلك البكتين الذى يعتبر من الكربوهيدرات الأكثر تعقيداً. وعلى هذا لابد أن يحتوى المحلول الإنزيمى المستعمل لهضم الجدار الخلوى على إنزيمات cellulase, hemicellulase و pectinase. ويتم الحصول عليها من بعض الفطريات مثل *Aspergillus nigra*, *Trichoderma viride* أو بعض المصادر الأخرى كبعض القواقع. ويختلف الفعل الإنزيمى قليلاً لكنه قد يكون مؤثراً باختلاف مصدره ومن ثم قد يضطر إلى تجريب إنزيمات من مصادر مختلفة للتغلب على الاختلافات الموجودة فى

تركيب الجدر الخلوية فى الأنواع المختلفة أو فى نفس الخلايا النامية تحت ظروف متباينة. ومن النادر استعمال إنزيمات عالية النقاوة نظراً لارتفاع ثمنها ولأن الشوائب كالأينزيمات الأخرى لها أثر إيجابى فى هدم الجدار الخلوى وحتى بعض المستحضرات النقية مثل cellulase R-10 تحتوى على كميات من إنزيمات أخرى.

وتحتوى المستحضرات التجارية لإنزيمات الفصل مثل Driselase على خليط من إنزيمات cellulase, hemicellulase و laminarinase و xylanase و pectinase وهو ذو فاعلية فى عملية العزل. لكن يجب أن يؤخذ فى الاعتبار أن بعض الشوائب مثل proteases و lipases و ribonucleases وبعض المواد الفينولية والأملاح لها تأثير سلبى على كمية البروتوبلاست المعزولة وكذلك حيوية البروتوبلاست وقدرته على التكشف. ولهذا قد تتم عملية تنقية جزئية لمحلول الإنزيمات المستعمل بالترشيح فى حالة مواجهة بعض الصعوبات فى عملية الفصل والزراعة. ومن المهم أن يقلل زمن تعرض الخلايا لمحلول الهضم، لتقليل الضرر الحادث من الإنزيمات والشوائب إلى أقل حد ممكن. ويتراوح زمن الهضم فى الغالب من ٤-١٢ ساعة وباستعمال ١٠ مل من مخلوط الهضم لكل جرام واحد من الأنسجة. ويتم ذلك على درجة الحرارة ٢٥-٣٠° م على الرغم أنها ليست المثلى لعمل إنزيمات الهضم والتى تتراوح بين ٤٠-٥٠° م ورقم هيدروجينى ٦.٠-٤.٧.

قد لا تتمكن الإنزيمات المضافة للنسيج المستعمل لعزل البروتوبلاست من الوصول إلى الجدار الخلوى مباشرة حيث تمثل طبقة الكيوتيكل والبشرة الخارجية عائقاً للوصول للإنزيمات والتى تعتبر جزيئات ذات حجم كبير نسبياً إلى الجدر الخلوية. ولتسهيل عمل الإنزيمات يقطع النسيج المستعمل بعد نزع طبقة البشرة باليد إن أمكن إلى شرائح صغيرة بعرض ١-٢ مم، أو يتم عمل بعض الجروح السطحية فى النسيج باستعمال فرشاة ناعمة. وعادة يمكن الحصول على مليون إلى ٥٠ مليون بروتوبلاست

من جدام واحد من أنسجة الأوراق حديثة النمو. أما الكالس فيجب تقسيمه إلى أجزاء صغيرة قبل المعاملة بالإنزيم. وقد يتم إذابة المحلول المستعمل ليخضع تحت تفرغ لتمكين الإنزيمات من النفاذ إلى الجدر الخلوية. وقد تمكن (Scott et al., 1978) باستخدام التفريغ تقليل الوقت الضروري لعمل الإنزيمات من ساعتين إلى عدة دقائق. ويرى البعض وضع المخلوط مع الأنسجة على أجهزة رج ذات سرعة منخفضة جداً لتسهيل عمل الإنزيمات وعزل البروتوبلاست.

٢. ضبط الضغط الاسموزي لوسط الفصل

كما سبق القول يعتبر الضغط الاسموزي للمحلول المستعمل في فصل البروتوبلاست العامل المحدد لنجاح هذه الخطوة. ويتباين الضغط الاسموزي للبروتوبلاست طبقاً لظروف نمو النبات الأم ونوع النسيج. والبروتوبلاست أكثر ثباتاً في المحلول ذو الأسموزية العالية عن المنخفض، فإذا استعمل محلول له ضغط اسموزي ذو قيمة سالبة عالية جداً حدثت بلزمة شديدة في البروتوبلاست فيمنع انفجاره وبرعته. لكن تعتبر البلزمة نوع من الإجهاد الخلوي فيلاحظ انخفاض في حيوية البروتوبلاست ويزيد نشاط إنزيم nuclease وتقل عدد الريبوسومات وينخفض معدل امتصاص الأحماض الأمينية. وربما يرجع ذلك إلى انخفاض معدل تخليق البروتين وبعض عمليات التمثيل الأخرى. أضف إلى ذلك زيادة امتصاص بعض المواد السامة للبروتوبلاست بسبب البلزمة حيث تزيد نفاذية الغشاء لهذه الجزيئات. ولهذا السبب قد تتم عملية البلزمة كخطوة منفصلة قبل عزل البروتوبلاست إذا كانت الخلايا شديدة الحساسية للبلزمة للحد من امتصاص الجزيئات الضارة. ويتم ذلك باستعمال محلول ذو ضغط اسموزي مرتفع أولاً حتى لا يسبب انفجار البروتوبلاست ثم تضاف إنزيمات هدم الجدار.

ويتم ضبط الضغط الاسموزي لوسط العزل باستعمال بعض المواد ذات الضغط الاسموزي العالي والتي قد تكون أملاح متأينة مثل كلوريد الكالسيوم بتركيز ٥٠-١٠٠

مليمول أو البوتاسيوم أو سلفات الماغنسيوم (٤٠ مليمول). وتلك المركبات لا تدخل في عمليات التمثيل بالمرّة أو تتم لها عملية التمثيل ببطء وبذلك يحافظ على الضغط الاسموزي للوسط. ويفضل استعمال مواد غير متأينة للغرض ذاته وهي عبارة عن السكريات الكحولية مثل السوربيتول والمانيتول (بتركيز ٤٥٠-٧٠٠ مليمول) والتي لا تدخل في عمليات التمثيل لذا يظل الضغط الاسموزي للوسط ثابتاً. أما سكريات الفركتوز والجلوكوز والسكرور فنادراً ما تستعمل حيث يحدث لهما هدم في الخلايا وبذلك يتغير الضغط الاسموزي للوسط مسبباً بعض المشاكل. وبالرغم من ذلك قد يستعمل السكرور بتركيز ٠.٣-٠.٧ مولر أو الجلوكوز إذا كان من المرغوب حدوث ارتفاع تدريجي في الضغط الاسموزي. ولنفس السبب يمكن استعمال خليط من المواد النشطة أيضاً مع مادة غير نشطة.

٣. المعاملة الأولية للجزء النباتي المستعمل

إن ظروف نمو النسيج النباتي المستعمل لعزل البروتوبلاست في غاية الأهمية لنجاح عزل وزراعة البروتوبلاست. ومن هذه العوامل الحرارة، والضوء، والرطوبة، وعمر النسيج. وتعتبر الظروف المثلى لنجاح ذلك محل تجريب لتباين تركيب الجدار الخلوي تحت ظروف النمو المختلفة. وعموماً تعمل الظروف المثلى لنمو وانقسام الخلايا على زيادة محصول البروتوبلاست المعزول نظراً لقلة سمك الجدار الخلوي وربما تساعد على الكشف لاحقاً. ويمكن تحقيق ذلك بتنمية النباتات في الظلام لمدة ٢٤-٧٢ ساعة وعلى درجة حرارة ٤-١٠° م قبل استعمالها كمصدر للبروتوبلاست، أو زيادة معدل التسميد الأزوتي للنباتات. أما إذا كان مصدر البروتوبلاست هو المعلق الخلوي فينصح بتجديد المعلق المستعمل كل أسبوع مع زيادة نسبة الأوكسين المستعمل وتقليل الكربوهيدرات في بيئة النمو قبل استعمال المعلق لعزل البروتوبلاست. ويؤثر عمر النبات المستعمل في عملية نجاح عزل البروتوبلاست، فمثلاً يتم عزل بروتوبلاست

الدخان وعمر النبات ٤٠-٦٠ يوم بعد الإنبات وذلك للحصول على بروتوبلاست ذو حيوية عالية ولأسباب غير معروفة وجد أن كمية البروتوبلاست المعزولة من أنسجة النباتات المزهرة منخفضة. وينصح باستعمال مزارع الأشتاء لسهولة التحكم في ظروف النمو. وفي حالة استخدام المعلق الخلوي يجب تجديد المزرعة كل ٣-٧ أيام وتؤخذ الخلايا وهي في طور اللاجي.

٤. تنقية البروتوبلاست

بعد معاملة الأنسجة بالإنزيمات يتم تحريك الأنسجة بلطف حتى يتحرر البروتوبلاست من الأنسجة. ويجب الإسراع في إزالة مخلوط الإنزيمات وبقايا الأنسجة المتحللة وكذلك البروتوبلاست غير الحي والخلايا الميتة بمجرد عزل البروتوبلاست من الجدار الخلوي خاصة إذا كان مصدر البروتوبلاست أنسجة نباتية. حيث يتحرر منها بعض الإنزيمات والمواد الفينولية التي قد ترتبط ببعض الإنزيمات غير النشطة وتنشطها مما يقلل من حيوية البروتوبلاست. ويتم ذلك غالباً بفصل ناتج عملية الهضم باستخدام مصفاة لحجز بقايا الخلايا كبيرة الحجم ثم استخدام قطعة من قماش النيلون ذات أقطار ٥٠-١٠٠ ميكرومتر لتسمح بمرور البروتوبلاست. وتضمن هذه الطريقة الحصول على بروتوبلاست ذو أقطار واحدة. وللحد من التأثير الضار للخلايا الميتة والمصابة اضاف (Ochatt & Power 1992) محلول ٠.٥% من potassium dextran sulphate لمحلول الهضم. وبعد هذا الفصل المبدئي يمكن استعمال الطرد المركزي عدة مرات وإعادة انتشار البروتوبلاست في وسط جديد ذو ضغط اسموزي مناسب (٢٠% سكروز على سبيل المثال). ويجب توخي الحذر الشديد واستعمال سرعة منخفضة لجهاز الطرد المركزي (100 g) لمدة ٧-١٠ دقائق حتى لا يحدث ضرر للبروتوبلاست السليم. يتم بعدها سحب البروتوبلاست السليم الطافي في المنطقة الفاصلة بين المحلول السكري ومحلول استخلاص البروتوبلاست بحذر شديد باستعمال ماصة ذات فتحة واسعة ويعاد

انتشار البروتوبلاست فى وسط جديد لإعادة التنقية مرة أخرى. وهناك طرق أخرى لإجراء عملية التنقية تعتمد على نفس الأساس السابق. ويمكن الاستدلال على حيوية البروتوبلاست بعد الفصل باستعمال بعض الصبغات التى تميز الأغشية الحية مثل Calcofluor White (CFW) و Pheosafranine و Flurescein diacetate (FAD) لكن الدليل القاطع على حيوية البروتوبلاست وجدوى الطريقة المستعملة للفصل هو تكوين الجدار الخلوى وحدوث الانقسام الخلوى.

يعتبر البروتوبلاست خلية نباتية تحت ظروف إجهاد من المحلول الاسموزى والمواد الأخرى الموجودة بمحلول العزل وكذلك المواد الناتجة من أيض البروتوبلاست نفسه. وتسبب عديد من هذه المؤثرات بلزمة للبروتوبلاست، ويكون معظم الإجهاد راجعاً لتأثير البلزمة والضغط الاسموزى وليس لإزالة الجدار الخلوى فى حد ذاته. وبمجرد إزالة مخلوط الإنزيمات فإن البروتوبلاست يتجه إلى الأقلمة مع الظروف الجديدة. وقدرة البروتوبلاست المعزول من المعلق الخلوى على الأقلمة أعلى من ذلك المعزول من أنسجة نباتية، حيث أن ظروف نمو المعلق الخلوى تشبه إلى حد كبير ظروف عزل وزراعة البروتوبلاست إن لم تكن واحدة. لكن حتى فى الظروف المثلى من الضغط الاسموزى وخلافة فإن بعض البروتوبلاست ينفجر لإسباب غير معروفة ويستمر ذلك غالباً لمدة يوم.

وبمجرد الأقلمة يلاحظ سرعة معدل تخليق البروتينات خاصة تلك المسنولة عن مقاومة الإجهاد ويعاد تخليق الجدار الخلوى. ويعتبر بدء تغيير الشكل الخارجى للبروتوبلاست من الكروى إلى المستطيل هو مؤشر تخليق الجدار الخلوى، كما يلاحظ زيادة فى معدل تخليق عضيات الخلية والتنفس والأحماض النووية فى هذه المرحلة. ومن غير المعروف حتى الآن لماذا لا يستمر انقسام البروتوبلاست فى غياب الجدار الخلوى إلا أن هذه حقيقة مؤكدة. ويبدأ التكوين التلقائى لمكونات الجدار الخلوى عقب الطور

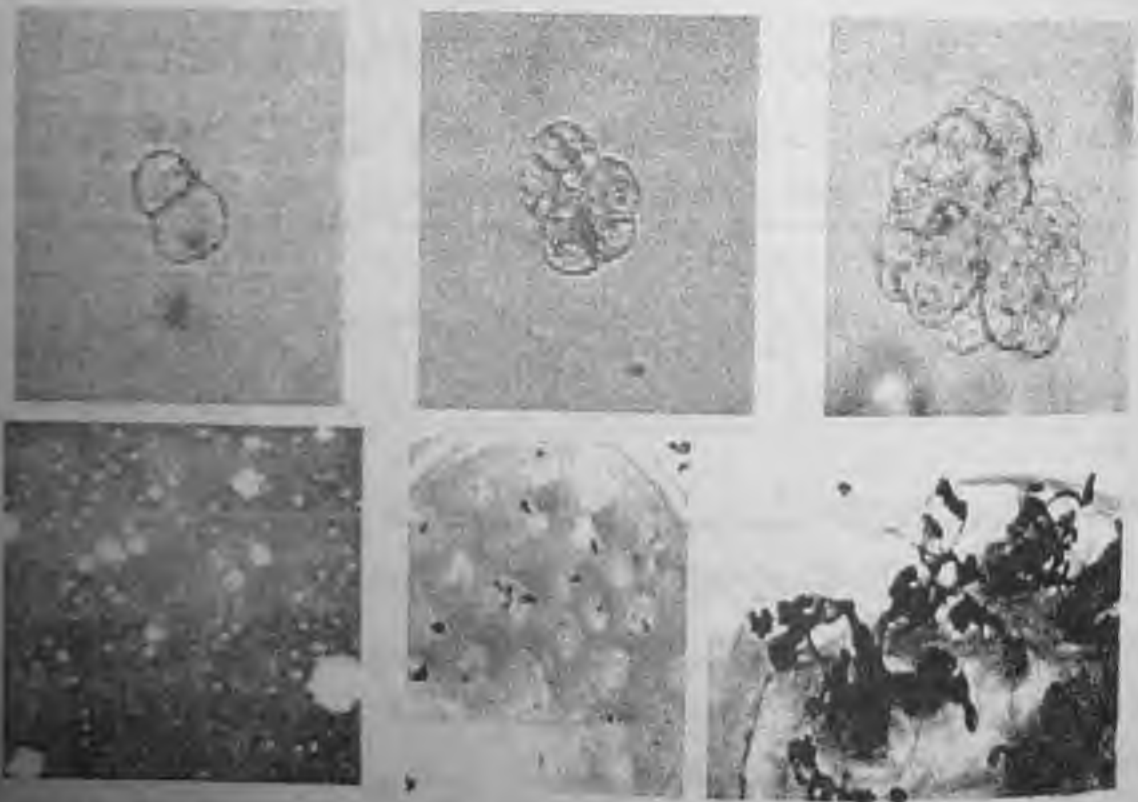
اللاجى Lag من مراحل نمو الخلية وقد يحدث ذلك أيضاً أثناء عمليات الأقامة. وتختلف مدة الطور اللاجى للبروتوبلاست باختلاف الأنواع النباتية وغالباً تتراوح بين ثلاث ساعات ويومين فى *Brassica*، وتصل فى البقوليات إلى أربعة أيام وتطول هذه المدة إلى أسبوع فى بعض الأشجار. ويمتاز الجدار الخلوى المتكون حديثاً بقصر السلاسل السيلولوزية المكونة له مع غياب الهيمسليولوز الذى يلاحظ وجوده بتركيز عالى فى البيئة المحيطة، وذلك لعدم وجود عدد كاف من لويغات السيلولوز لربط الهيمسليولوز ضمن مكونات الجدار (Razdan, 2002).

أما بعد الزراعة فيتطلب التغير الحادث فى مزارع البروتوبلاست نتيجة الأقامة للظروف الجديدة وإصلاح الضرر الواقع عقب نزع الجدار الخلوى وتكوين الجدار الجديد مكونات بيئية محددة تتلاءم مع العمليات الأيضية الجديدة. فعلى سبيل المثال وكما ذكر سابقاً لابد من خفض قيمة الضغط الاسموزى تدريجياً إما بإضافة بيئة جديدة ذات ضغط اسموزى منخفض أو باستعمال مواد ذات ضغط اسموزى مرتفع لكنها تدخل فى عمليات التمثيل مثل السكرورز فيخفض مقدار الضغط الاسموزى للبيئة تدريجياً. كذلك تقل الحاجة للأوكسينات تدريجياً حيث تتطلب المزرعة فى البداية تركيز عالى منها لدفع عملية الانقسام، ويستثنى من ذلك بروتوبلاست النجيليات حيث يحتاج إلى تركيز منخفض من الأوكسين فى البداية ثم تركيز مرتفع منها لاحقاً. ولتحقيق إمكانية تغير محتويات البيئة فإن البروتوبلاست يزرع فى بيئة سائلة فى البداية. ويثبط الضوء الشديد انقسام بروتوبلاست خلايا ميزوفيل أوراق الدخان لذا يفضل زراعة البروتوبلاست عموماً فى الظلام ثم ينقل بعد ذلك للضوء (Bhojwani & Razdan, 1996).

٥. زراعة البروتوبلاست

يدخل البروتوبلاست فى سلسلة من الانقسامات فى بيئة الزراعة الجديدة ليكون كتلاً جديدة من خلايا الكالس. وقد أمكن توجيه هذه الانقسامات فى بعض الأنواع لتكوين

أجنة جسمية تتكشف إلى نباتات كاملة كما في الشكل رقم (٦-١٧). واستخدمت هذه الظاهرة بنجاح في التحسين النباتي لبعض النباتات بتحويل المحتوى الوراثي للبروتوبلاست قبل إعادة تكوين الجدار الخلوي والانقسام حيث يمكن إدخال البلازميد إلى البروتوبلاست. وتختلف زراعة البروتوبلاست عن زراعة الخلايا النباتية من حيث ضرورة استعمال بيئة ذات ضغط اسموزي مرتفع، والفرق الثاني هو اختلاف عمليات الأيض والتكشف في مزارع البروتوبلاست عن مزارع الخلايا حيث تتم إعادة تكوين الجدار الخلوي وانقسام الخلايا وتكون الكالس قبل الكشف. ولابد من ضمان وجود عدد من المركبات العضوية أو بعض المواد المغذية المعقدة التركيب الهامة في إعادة تكوين الجدار الخلوي، وعلى هذا يلاحظ الاختلافات التالية في مكونات بيئة زراعة البروتوبلاست (Veilleux et al., 2005):



شكل ٦-١٧: توالى انقسام البروتوبلاست في الصف العلوي ثم تكوين الكالس (أسفل يسار) وتكوين الأجنة الجسمية ونباتات نباتات البرسيم الحجازي (أسفل وسط ويمين) (www.medicago.com)

١. تعتبر الأمونيا مهمة لإنقسام الخلايا لكنها عند تركيز ٢٠ مليمول تعتبر سامة للبروتوبلاست وتقلل من حيوية البروتوبلاست. ولذا يجب خفض تركيزها الى نصف أو ربع التركيز الشائع في البيئات المعتادة.

٢. احتوائها على ضعف التركيز المستعمل في زراعة الأنسجة من الحديد والزنك.

٣. زيادة تركيز الكالسيوم بمعدل ٢ : ٤ مرات لمنع تجمع البروتوبلاست في كتل بنية اللون في المراحل الأولى من الزراعة، على أن يتم خفض تركيز الكالسيوم عقب تكوين الجدار الخلوى واستهلال الانقسام.

نظرا للحساسية الشديدة للبروتوبلاست لمكونات البيئة لابد من تلافي وجود بعض المواد التي قد تسبب سمية مثل الأجار والذي يستعاض عنه باستعمال الأحاروز على النقاوة. يجب ان تتم زراعة وتداول البروتوبلاست في الظلام أو ضوء شاحب لحساسيته الشديدة للضوء. وتتم الزراعته في البيئة المغذية شبه الصلبة والتي تبدو أنها أفضل لنموه حيث يوفر ثباتها الظروف المثلى للنمو والتطوير. ولكن على الرغم من هذه الحقيقة فإن Bhojwani & Razdan (1996) يوضح بعد استعراض العديد من الدراسات اربعة أسباب لإستخدام البيئة السائلة في زراعة البروتوبلاست وهى:

أ. لا ينقسم بروتوبلاست بعض الأنواع النباتية في البيئة المتصلبة.

ب. يمكن بسهولة خفض الضغط الأسموزى للبيئة بعد عدة أيام من الزراعة بتخفيف البيئة.

ج. بفرض تخليق بعض المواد الضارة التي ربما تسبب قتل البروتوبلاست أثناء إعادة تكوين الجدار الخلوى والنمو فإن استعمال البيئة السائلة يقلل من هذا الضرر.

د. يمكن التحكم فى كثافة البروتوبلاست عقب الزراعة كذلك إمكانية عزل بعض الخلايا ذات الصفات الخاصة عقب تكوين الجدار بعد عدة أيام من الزراعة، وإن كان هناك صعوبة فى فصل المستعمرات الفردية حيث يميل البروتوبلاست إلى التجمع فى صورة مجموعات. وتتم زراعة البروتوبلاست فى كلتا البيئتين بعدة طرق منها:

١. زراعة البروتوبلاست في صورة معلق في طبقة رقيقة جداً من البيئة السائلة في طبق بترى.

٢. زراعته في طبق بترى في شكل قطرات دقيقة جداً بحجم ١٠٠ - ٢٠٠ ميكروليتر.

٣. الزراعة فيما يعرف بالنقطة المعلقة وحجمها ١٠-١٠٠ ميكروليتر على السطح الداخلي لغطاء طبق بترى.

٤. الزراعة في بيئة سائلة فوق بيئة شبة صلبة.

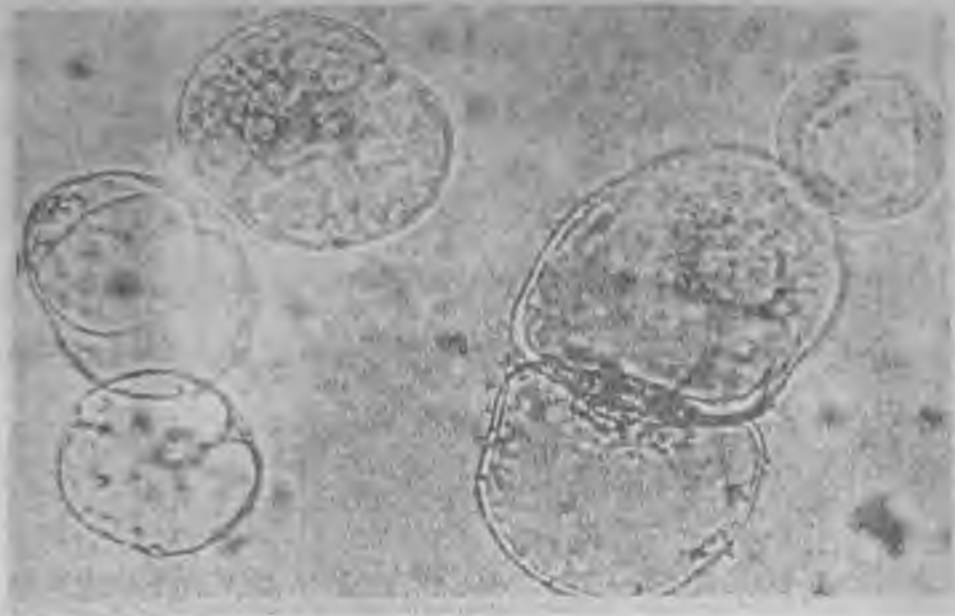
٥. استعمال المزرعة الحاضنة إذا كان هناك ضرورة لزراعة البروتوبلاست في صورة فردية كان تتم الزراعة بعد دمج البروتوبلاست أو الرغبة في انتخاب طراز معين من البروتوبلاست بعد إجراء تعديل وراثي. حيث يتعارض ذلك مع ضرورة زراعة البروتوبلاست بكثافة تتراوح بين خمسة آلاف إلى مليون لكل ملييلتر واحد من البيئة. والتركيز الأمثل للزراعة هو خمسون ألف حتى يتسنى للبروتوبلاست الانقسام والنمو. ولتحقيق ذلك يمكن تقليل حجم المزرعة جداً باستعمال القطرات الدقيقة المعلقة. أما الطريقة الأخرى فهي استعمال المزرعة الحاضنة التي تمكن العدد القليل جداً من البروتوبلاست من النمو والانقسام حيث تقوم المزرعة الحاضنة بمدّه بالعناصر المغذية ومتطلبات النمو الأخرى. وغالباً ما تكون هذه المزرعة هي نفس الخلايا التي استعملت كمصدر للبروتوبلاست بشرط أن تكون في حالة نشطة من النمو مع ضرورة الفصل الميكانيكي بين المزرعة الحاضنة والبروتوبلاست. ويتم ذلك إما بوضع غشاء فاصل بين الاثنين أو خلط هذه الخلايا مع البروتوبلاست، بشرط وجود ما يميزها كاحتوائها على صبغة لا توجد بالبروتوبلاست. كما استعملت خلايا معرضة للإشعاع لتنشيط انقسامها أو استعمال راشح نمو المعلق الخلوي حيث أنه يحتوي أيضاً على المواد اللازمة للنمو.

٦. الزراعة فى بيئة صلبة وهو ما يعرف بـ Bergmann cell plating technique عن طريق خلط كمية من معلق البروتوبلاست تركيزها يساوى ضعف التركيز النهائى المطلوب من البروتوبلاست مع البيئة المستعملة للزراعة على أن تكون محتوية على ضعف التركيز النهائى من الأجاروز والمواد الأخرى. ويتم الخلط برفق والبيئة على درجة حرارة 40°C ثم تصب فى طبقة رقيقة فى أطباق بترى وتغلق ثم تحضن. وبعد نجاح تكوين المستعمرات يتم فصلها وزراعتها بصورة فردية. ويلاحظ توقف انقسام البروتوبلاست فى بيئة الزراعة إذا لم يتم تعديل الضغط الاسموزى عقب الانقسامات الأولى للخلية.

وكما أن هناك حد أدنى من الكثافة لزراعة البروتوبلاست فهناك أيضاً حد أعلى حيث يجب ألا تزيد كثافة الزراعة عن مليون بروتوبلاست لكل مل من البيئة. حيث تؤدي زيادة التركيز إلى زيادة عدد البروتوبلاست غير السليم والتنافس على مكونات البيئة. ويجب التنويه إلى أنه لا يمكن معالجة عدم النقاوة بزيادة عملية التنقية حيث يسبب ذلك ضرر للبروتوبلاست السليم.

يمكن التعرف على نجاح زراعة البروتوبلاست من السلوك المبدئى له أثناء الإعداد للزراعة وأول هذه الملاحظات هى بدء التحول من الشكل الكروى المميز للبروتوبلاست وحدث انتفاخ للخلية مما يعكس النشاط التمثيلى وبدء تكوين الجدار الخلوى (شكل رقم ٦- ١٨). ويمكن الاستدلال على تكوين الجدار الخلوى بالصبغات المميزة لمكونات الجدار. وتحدث هذه العملية خلال ٢-٤ يوم من الزراعة طبقاً للنوع النباتى. ويحدث الانقسام الأول للخلية بعد ذلك بفترة وجيزة من تكوين الجدار، ومن الثابت عدم الإنقسام إلا عقب تكوين الجدار، وبفشل تكوين الجدار يلاحظ برعمة البروتوبلاست وربما زيادته فى الحجم عدة مرات وتعدد النويات ويعد عدم الغسيل الجيد للبروتوبلاست واحتواء المعلق البروتوبلاستى على بروتوبلاست حى وآخر ميت تتحرر منه بعض المواد الضارة أحد اسباب فشل الإنقسام. وإذا كان عدد البروتوبلاست الذى

ملت قبل الزراعة كبير فلابد من تخفيف البيئة المستعملة لنضج بالتالى تخفيف تركيز المواد السامة فى البيئة.



شكل ١٨-٦: انقسام البروتوبلاست عقب عزله ويلاحظ البروتوبلاست الكروى فى أعلى الصورة يمين وأسفل يسار، ومرحلة مبكرة من الانقسام أعلى يسار. أما فى أسفل الصورة يمين بروتوبلاست وقد كون الجدار الخلوى وتم الانقسام (Veilleux et al., 2005).

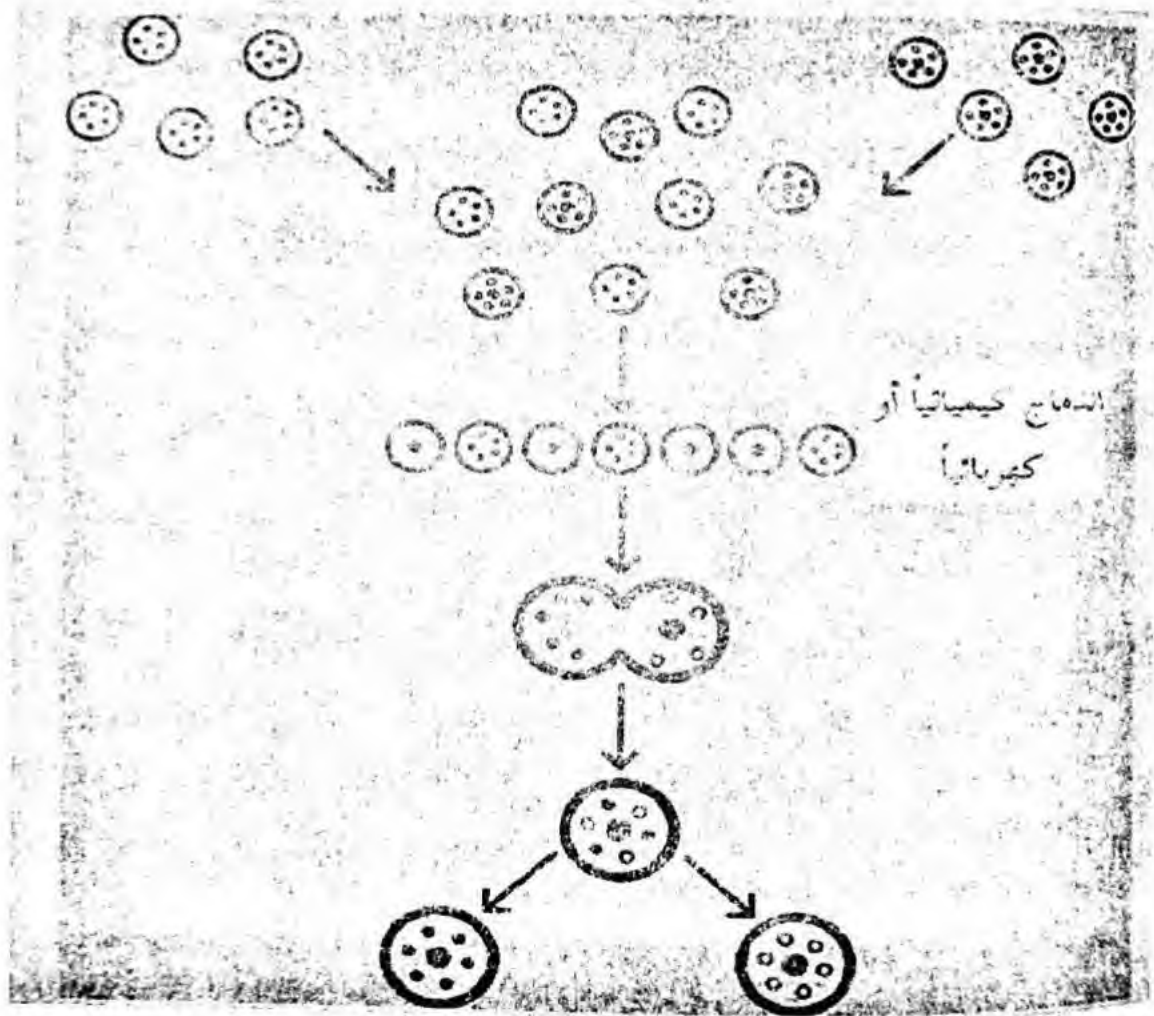
ويلاحظ تكوين مستعمرات فردية ناتجة من انقسام البروتوبلاست خلال ٦-٣ أسابيع من الزراعة التى يمكن فصلها وزراعتها بصورة فردية. كما سبق القول يتمكن بعض البروتوبلاست عقب الزراعة من الانقسام وتكوين مستعمرات فردية ويطلق على النسبة بين البروتوبلاست الذى تمكن من النمو والانقسام والعدد الكلى للبروتوبلاست المنزرع مصطلح كفاءة الزراعة *plating efficiency* وتختلف هذه النسبة باختلاف الأنواع والطرز الوراثية حتى شديدة القرابة وكذلك طريقة العزل والزراعة، وغالباً ما تكون هذه النسبة منخفضة. وقد أورد (Bhojwani & Razdan, 1996) العشرات من الدراسات حول استخدام مزارع البروتوبلاست فى الإكثار الدقيق.

دمج البروتوبلاست وإنتاج الهجن الجسدية

حتى بداية السبعينيات من القرن الماضي لم تكن هناك طريقة لنقل صفة وراثية من نبات إلى آخر سوى التهجين الجنسي. حتى استطاع (Power *et al.* (1970 إجراء أول عملية دمج بروتوبلاستى بين بروتوبلاست الذرة والشوفان. وبالرغم من فشل هذه المحاولة فى الحصول على نبات بعد الدمج إلا أنها كانت بمثابة بداية تطوير هذه التقنية واستخدامها فى التحسين الوراثى للنبات، إذ استطاع بعدها (Carlson *et al.* (1972 بالتعاون مع آخرين الحصول على أول نبات هجين باستعمال الدمج بين بروتوبلاست *Nicotiana Glauca* و *N. Langsdorffii*. وفى عام ١٩٧٨ كان النجاح العملى لهذه التقنية على يد (Melchers *et al.* (1978 بالتغلب على عدم التوافق الموجود بين الأجناس والحصول على هجين جسدى سمي Pomato ناتج من تهجين جنسين مختلفين هما البطاطس *Solanum Tuberosum* والطماطم *Lycopersicum esculentum* لكن كانت كل النباتات الناتجة عقيمة.

وتجدر الإشارة إلى أنه من الممكن حدوث دمج تلقائى للبروتوبلاست أثناء العزل حيث يلاحظ وجود خلايا عديدة الانوية وبالفعل تم تأكيد ذلك بالفحص الدقيق بالمجهر الإلكتروني، لكن معدل النجاح بالاعتماد على الدمج التلقائى ضعيف جداً. وقد ساهمت التقنية الحديثة فى زراعة الأنسجة من استعمال زراعة الخلايا والبروتوبلاست والذى يعتبر أصغر وحدة حية من النبات فى التحسين الوراثى لبعض النباتات الهامة اقتصادياً. حيث يمكن إجراء الدمج الخلوى (شكل رقم ٦-١٩) والتحول الوراثى والانتخاب على مستوى البروتوبلاست (Johnson & Veilleux, 2001) و (Rakoczy-Trojanowska, 2002) ونظرياً يمكن دمج أى نوعين من البروتوبلاست إذا توفرت الظروف الملائمة لذلك بصرف النظر عن مصدر البروتوبلاست. ويمكن عن طريق هذه التقنية تحقيق الكثير من المميزات والتى قد تكون مستحيلة بالطرق التقليدية ومن تلك التطبيقات:

١. إمكانية نقل صفات هامة كمقاومة إجهاد بيئي أو حيوي من نبات إلى آخر والتي قد لا يمكن أن تتحقق بالتهجين الجنسي. فعلى سبيل المثال تم الحصول على هجين مقاوم لبعض الأمراض باستعمال بروتوبلاست *Solanum tuberosum* و *S. Brevidens* وكذلك هجن *Brassica* مع أحد الأجناس البرية التابعة لها مقاوماً لبعض الأمراض الفطرية والبكتيرية. أما الهجين الجسدي للطماطم مع النبات البري *L. peruvianum* فقد كان مقاوماً للصقيع. وقد عدد (Chawla 2000) هذه الهجن ضمن أربعين هجيناً مختلفاً تم الحصول عليها بدمج البروتوبلاست لنقل الصفات المقاومة للأمراض، الحشرات، الملوحة، مبيدات الحشائش وكذلك زيادة إنتاج بعض المركبات الثانوية، ويوضح جدول رقم (٦-٢٤) بعض هذه الهجن.



شكل ٦-١٩: رسم تخطيطي يبين إندماج نوعين مختلفين من البروتوبلاست لتكوين هجين جديد.

٢. إمكانية الحصول على نباتات رباعية العدد الكروموسومي وكذلك النباتات الشبيهة بالثنائي Amphidiploids في حالة صعوبة ذلك باستعمال الكوليشيسين.

٣. الحصول على هجن من نباتات تحمل صفة العقم الذكري أو من نباتات ذات أعضاء جنسية غير تامة التكوين. فقد أمكن بدمج بروتوبلاست نباتات بطاطس أحادية متضاعفة بها صفة العقم الذكري الحصول على نباتات رباعية خصبة.

جدول ٦-٢٤: بعض الهجن ذات الصفات الجديدة والتي تم الحصول عليها من دمج بروتوبلاست أنواع مختلفة (Chawla, 2000).

الصفة الجديدة للهجين	الهجين الجسدي
مقاومة فيروس تبرقش الأوراق	<i>Nicotiana glauca</i> X <i>N. glauca</i>
زيادة تركيز النيكوتين	<i>N. glauca</i> X <i>N. glauca</i>
مقاومة فيروس X	<i>Solanum tuberosum</i> X <i>S. tuberosum</i>
مقاومة فيروس التفاف الأوراق	<i>S. tuberosum</i> X <i>S. tuberosum</i>
مقاومة <i>Phytophthora</i>	<i>S. tuberosum</i> X <i>S. tuberosum</i>
مقاومة الصقيع	<i>S. tuberosum</i> X <i>S. tuberosum</i>
مقاومة الليماتودا	<i>S. tuberosum</i> X <i>S. tuberosum</i>
مقاومة الصقيع والملوحة	<i>Hordeum vulgare</i> X <i>Daucus carota</i>
الصفة الجديدة للهجين	التهجين السيتوبلازمي Cybrid
المقاومة لـ Streptomycine	<i>N. glauca</i> X <i>N. glauca</i>
المقاومة لمبيدات الحشرات Triazine	<i>N. glauca</i> X <i>N. glauca</i>
نقل صفة العقم الذكري السيتوبلازمي	<i>N. glauca</i> X <i>N. glauca</i>
نقل صفة العقم الذكري السيتوبلازمي	<i>S. tuberosum</i> X <i>S. tuberosum</i>

٤. التهجين بين نباتات غير بالغة والتي تصل إلى النضج الجنسي بعد مدة طويلة وهي نقطة هامة في تربية النباتات.

٥. من المعروف في الإكثار الجنسي انتقال السيتوبلازم للنسل الجديد من النبات الأم فقط عبر البويضة أما حبة اللقاح فلا تحمل عضيات السيتوبلازم. وفي المقابل يتم نقل سيتوبلازم كلا الأبوين إلى النسل في الدمج البروتوبلاستي، فيمكن بذلك نقل بعض الصفات كالمقاومة لبعض المبيدات أو العقم الذكري التي قد توجد في عضيات سيتوبلازم (الكلوروبلاست والميتوكوندريا) من كلا الأبوين إلى النسل. وغالباً يتم تكوين اتحادات جديدة من المادة الوراثية للميتوكوندريا، وعلى العكس ينذر تكوين هذا الاتحادات الجديدة للمادة الوراثية الموجودة بالكلوروبلاست

(Bhojwani & Razdan, 1996). لكن يحدث إعادة انعزال جديدة حيث يحدث استبعاد لكلوروبلاست أحد الأبوين وبهذا ينتج تركيب جديد يحمل بعض الصفات الوراثية لكلا الأبوين. ويمكن استبعاد نواة أحد الأبوين بالإشعاع مثلاً ويسمى الناتج في هذه الحالة بـ Cybrids إذا لم يحدث دمج للنواتين أو Cytoplasmic hybrids إذا تم دمج النواتين. بمعنى آخر يمكن الحصول على هجين سيتوبلازمي في خطوة واحدة دون الحاجة إلى إجراء ٨-١٢ دورة من التلقيح الرجعي. ويوضح جدول رقم (٦-٢٥) بعض الهجن التي تم الحصول عليها من دمج بروتوبلاست أجناس مختلفة، لكن كل هذه الهجن كانت عقيمة ولم تنتج بدور. لكن حتى بفرض وجود طرق مثلى لعملية العزل والدمج فإن هناك العديد من المشاكل والصعوبات التي تحد من استخدام تلك التقنية بغرض التحسين وهي:

١. صعوبة عملية الانتخاب بعد التهجين واحتمال عدم وجود طريقة لإحداث الكشف بعد الدمج.

٢. قد يكون الناتج النهائي لعملية التهجين غير متزن غالباً كان يكون عقيم أو به خلل تركيبى أو غير ثابت خاصة لو تم بين آباء بعيدة من الناحية التقسيمية. أو حتى باستعمال خلايا في مراحل مختلفة من التطور.

٣. نمو كالس به كيميرا بدلاً من الهجين إذا لم يتم الدمج النووي عقب دمج البروتوبلاست وتنقسم كل نواة مستقلة عن الأخرى وقد تفقد الكيميرا بعد ذلك أثناء الكشف.

٤. التهجين بين نباتين ثنائيي ينتج عنه نباتات Amphidiploid غير مرغوبة في برامج التربية ويمكن التغلب على ذلك بتهجين خلايا أحادية.

٥. الناتج الوراثي لعملية التهجين متباين غالباً ويرجع ذلك إلى الاستبعاد الكروموسومي، الانتقال، الانعزال في بعض عضيات السيتوبلازم مثل البلاستيدات والميتاكوندريا.
٦. انخفاض الثبات الوراثي في مزارع البروتوبلاست كما أنه ليس من المؤكد أن تعبر الصفة محل الاهتمام عن نفسها في النسل.

جدول ٦-٢٥: يوضح بعض الهجن التي تم الحصول عليها من دمج بروتوبلاست أجناس مختلفة (Chawla, 2000)

النوع النباتي الداخل في عملية التهجين وعدد الكروموسومات المميز له	الجنس الجديد
<i>Raphanus sativus</i> (2n= 18) X <i>Brassica olerace</i> (2n=18)	Raphanobrassica
<i>B. olerace</i> (2n= 18) X <i>Moricandia arvensis</i> (2n= 27, 28)	Moricandiobrassica
<i>Eruca sativa</i> (2n= 22) X <i>B. napus</i> (2n= 38)	Erucobrassica
<i>Diplotaxis muralis</i> (2n= 42) X <i>B. napus</i> (2n= 38)	Diplotaxobrasica
<i>N. tobacum</i> (2n= 48) X <i>Lycopersicon esculentum</i> (2n= 24)	Nicotiopersicon
<i>Solanum tuberosum</i> (2n= 24,48) X <i>L. esculentum</i> (2n= 24)	Solanopersicon
<i>Datura innoxia</i> (2n= 48) X <i>Atropa belladonna</i> (2n= 24)	Daturotropa
<i>Oryza sativa</i> (2n= 24) X <i>Echinochloa oryzicola</i> (2n= 24)	Oryzochloa
<i>Arabidopsis thaliana</i> (2n= 10) X <i>B. campestris</i> (2n= 20)	Arabidobrassica

طرق دمج البروتوبلاست

قبل البدء في دمج البروتوبلاست لابد من التأكد من وجود البروتوبلاست الحي وبعده وفير لضمان حدوث الدمج بنجاح. ولا يتوقف الأمر عند ذلك بل هناك

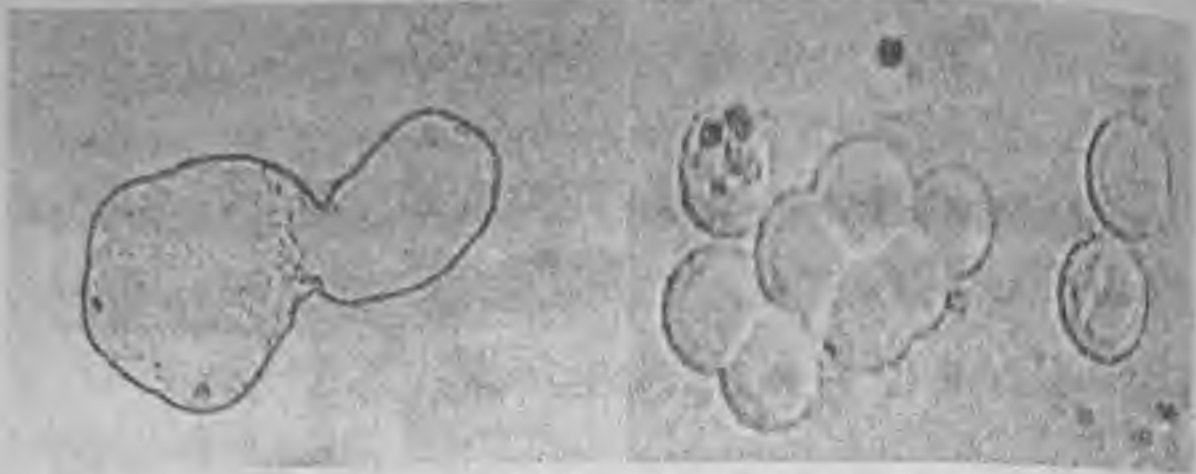
الكثير من الصعوبات العملية التي تعيق هذه العملية خاصة كلما قلت درجة القرابة بين النوعين. فبالرغم من أن الغشاء البروتوبلاستي غير قوى التركيب بالمقارنة مع الجدار الخلوي إلا أنه لا يزال يشكل عتبة ميكانيكية في سبيل الدمج البروتوبلاستي. وفي الحقيقة يميل بروتوبلاست بعض الأنواع الدخان إلى الاندماج بسهولة بمجرد رفع الرقم الهيدروجيني إلى ١٠.٥ مع وجود تركيز عالي من أيونات الكالسيوم. (Melchers & Labib, 1974)، لكن هناك بعض الأنواع يصعب دمجها. ولكي يتم الدمج لابد أولاً أن يكون البروتوبلاست ملاصقاً للآخر في مجموعات لا يزيد فيها البعد بين البروتوبلاستين عن ١٠ انجستروم. لذا يجب التخلص من الشحنات الكهربائية الموجودة على الغشاء والتي تتراوح بين -١٠ و -٣٠ مليفولت مسبباً تنافر البروتوبلاست.

وذلك مع مراعاة العمل على عدم ثبات تركيب الغشاء لوقت قصير لتتكون قنطرة بين البروتوبلاستين تسمح بمرور السيتوبلازم من ناحية إلى أخرى أو يتم اتساع المنطقة المتهتكة بين الغشائين فيتم الدمج. ثم تأتي المرحلة الثالثة بإعادة الغشاء إلى وضعه ويسمى الناتج من هذه العملية fusion product أو heterokaryons. وإذا حدث الدمج بين النواتين عقب ذلك سمي الناتج هجين hybrid. وتعتبر عملية الدمج عملية غير متخصصة بمعنى أنه لا يمكن معرفة أي من البروتوبلاست الذي سيتم دمجها وليس هناك ما يمنع من أن يتم دمج بروتوبلاستين أو أكثر من نفس الأب ليكون homokaryon وربما لا يتحقق الهدف من الدمج بين النوعين محل التجربة.

يتم الدمج باستعمال طريقة كيميائية تعتمد على زيادة تركيز أيونات الكالسيوم في وجود البولي إيثيلين جليكول (Benbadis & Virville, 1982) أو بعض المواد الأخرى مثل polyvinyl acetate أو بعض الليبدات، ويجب التخلص من هذه المواد عقب الدمج مباشرة. يعمل PEG على التخلص من الشحنات السالبة ونزع الماء

جزئياً من البروتوبلاست ثم تحدث هجرة للبروتينات المكونة للغشاء الخلوى فتتكون منطقة غنية فى اللييدات بسبب تلاحق البروتوبلاستين مع بعضهما وتستغرق هذه الخطوة ١٥-٣٠ دقيقة. ويرفع تركيز أيون الكالسيوم إلى ٥٠ مليمول من $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ فى وسط قلوى يصل إلى ٩-١٠ يتم الدمج وبمعدل قد يصل إلى ١٠٠%. وتعتبر طريقة (Kao & Michayluk, 1974) المعتمدة على هذه الفكرة الأكثر استخداماً حتى الآن، ومع ذلك فإن الآلية الدقيقة للدمج بهذه الطريقة غير معروفة بدقة (Bhojwani & Razdan, 1996). لكن يعيب هذه الطريقة صعوبة دمج نوعين مختلفين من البروتوبلاست، وحدث معظم الدمج بين نفس البروتوبلاست. كما أن PEG يعتبر سام للخلايا، وقد سجل خلل فى تركيب الميتاكوندريا عند دمج بروتوبلاست بعض الأنواع (Bates, 1985) وكذلك يقلل من انقسام وتكشف البروتوبلاست بعد الدمج إن لم يتم التخلص من مخلوط الدمج بدقة قبل الزراعة. ولهذا السبب وبالرغم من انخفاض تكاليف هذه الطريقة بالمقارنة مع الطريقة الكهربائية إلا أنها أقل استعمالاً منها.

أما الطريقة الأخرى والتي كان أول استخدام لها بواسطة Senda et al. (1979) وتعرف بطريقة الدمج الكهربائية electrofusion. وهى طريقة سهلة وسريعة فلا تستغرق إلا ١٥ دقيقة. ويمكن بواسطتها التحكم فى إحداث الدمج بين نوعين مختلفين من البروتوبلاست، فقد استطاع (Jones et al., 1990) الحصول على ١٢.٣% من الأشتاء الهجين بين *Solanum tuberosum* و *S. brevidens* بينما كانت هذه النسبة ٢.٦% باستعمل PEG. أضف إلى ذلك ما أشار إليه Asao et al. (1994) من ارتفاع معدل الخصوبة للنباتات الناتجة بالدمج الكهربائى. وكما هو الحال فى الطريقة الكيميائية فإن الدمج يحدث فى مرحلتين الأولى هى إحداث تجمعات من البروتوبلاست فى شكل سلسلة سبحية بين القطب السالب والموجب والثانية هى دمج الأغشية مع بعضها كما فى الشكل رقم (٦-٢٠).



شكل ٦-٢٠: تلاحق بروتوبلاستين كمرحلة سابقة لعملية الدمج على اليمين. وعلى اليسار يلاحظ حدوث اتصال تام بين الغشاءين السيتوبلازميين ودمج البروتوبلاستين معا (Gürel *et al.*, 2002)

ويتم ذلك بوضع البروتوبلاست في غرفة صغيرة تحمل على شريحة مجهرية. يتصل بالغرفة محقق مجهرى به البروتوبلاست المنتشر في وسط ذو توصيل كهربى ضعيف واسموزية عالية كالمائيتول. ويتم تعقيم الحجرة بتيار من الكحول لمدة ١٠ دقائق قبل غسلها بعناية بواسطة الماء المقطر المعقم. ويتم توفير فرق جهد كهربائى متغير بين طرفى الحجرة باستعمال قطبين من البلاتين المسافة بينهما ٢٠٠ ميكرومتر. بعد وضع البروتوبلاست بين القطبين يتم توليد فرق جهد عالى تردده (٠.٥ و ١.٥ ميجاهرتز) وبفرق جهد ١٠-٢٠٠ فولت /سم^٢. وبذلك يصبح الغشاء مشحون بشحنات كهربائية وتنجذب الأغشية ذات الشحنات المختلفة إلى بعضها البعض وتصبح موجودة في شكل حبات العقد. وبمجرد الحصول على هذه الحالة يتم استحداث نبضة أو اثنتين (١٠-٢٠ ثلثية) من تيار ثابت وبفرق جهد عالى (١٢٥-٠.١ كيلوفولت/سم^٢) حيث يسبب ذلك إلى خلل في تركيب الغشاء وإحداث ثقوب به تمكن من دمج البروتوبلاستين معا. ويمكن رفع معدل الدمج إلى ٦٠% (Lindsey & Jones, 1990) بمعاملة البروتوبلاست قبل الدمج بمحلول كلوريد الكالسيوم ومنظم النمو spermine.

وأخيراً بقى القول أن الدمج بتلك الطريقة أكثر نجاحاً مع البروتوبلاست المعزول من خلايا تحتوى على الكلوروبلاست دون ذلك الذى مصدره الكالس أو الجنور. ورغم كل ماسبق فإن الدمج باستعمال الطريقة الكيميائية ما زال واسع الاستعمال. وللمزيد حول هذه التقنية راجع (Bhojwani & Razdan (1996).

انتخاب الهجن الجسدية

بفرض وضع نوعين مختلفين من البروتوبلاست فى الظروف المثلى للدمج فإن ناتج العملية سيكون الدمج بين نفس البروتوبلاست، النوعين المختلفين من البروتوبلاست وقد يتم الدمج بين واحد أو أكثر من البروتوبلاست الموجود، وبعض البروتوبلاست غير المندمج. وتعتمد عملية إنتاج الهجين الجسدى فى أصلها على وجود النواتين المختلفتين وهو ما يعرف بـ heterokaryons عقب دمج البروتوبلاست ولا يتعدى معدل ذلك ٥-١٠ %، والأكثر من ذلك فإن نسبة بسيطة من هذا الناتج يتم فيه اندماج النواتين للحصول على هجين فريد فى نوعه، قد يعيقها العديد من التعقيدات التى تلى الاندماج الناجح. وتعتبر عملية انتخاب الهجين الجسدى الثانى Binary fusion فى غاية الصعوبة، حيث يصعب استعمال الانتخاب لبعض الطفرات والمضادات الحيوية وهى الطريقة الشائعة فى زراعة الخلايا الحيوانية. وعلى الرغم من ذلك استعملت بعض الطفرات مثل الالبينو فى الانتخاب على مستوى النبات بعد الكشف وبذلك تتجنب عملية الانتخاب فى مرحلة البروتوبلاست.

ويعتبر الانتخاب اليدوى هو الأكثر استخداماً، والذى يعتمد على احتواء كل نوع من البروتوبلاست على صفة مميزة مثل الكلوروبلاست أو حبات النشا والتى يمكن تمييزها بسهولة باستعمال المجهر. ويمكن تحقيق ذلك باستعمال بروتوبلاست معزول من أوراق أو بتلات أحد الآباء، وبروتوبلاست الأب الآخر والذى يتم الحصول عليه من المعلق الخلوى أو من أجزاء غير ملونه كدرنات البطاطس (Razdan, 2002).

والنحصول على بروتوبلاست به وفرة من حبات النشا يتم تنمية المعلق الخلوي في بيئة غنية في الكربوهيدرات. بذلك يمكن تحديد نتائج البروتوبلاست المندمج المحتوى على الصفتين المعروفتين سابقاً. بعد ذلك يتم عزل البروتوبلاست المندمج باستعمال ماصة أو ببعض الأجهزة الحديثة التي تعتمد على قياس الطيف الضوئي. وبالرغم من أن هذه الطريقة تستغرق وقتاً طويلاً إلا أنها تمتاز باستيعاد ناتج الدمج إذا كان يحتوي على أكثر من بروتوبلاستين. وإذا تم نجاح دمج أنويه الأبوين فإن الناتج يطلق عليه somatic hybrid وبعد انتخاب البروتوبلاست المندمج والنجاح في دفعه للتكثف وتكوين نباتات لاد من التأكد من توريث صفات الأبوين للنسل ويتم ذلك بعدة طرق منها:

١. وجود صفات مورفولوجية وسطية بين كلا الأبوين مثل ارتفاع النبات، شكل أو حجم الأوراق أو لون الأزهار. لكن لا يعمل كثيراً على هذه الصفات حيث أنها تتأثر بالبيئة وبظروف الزراعة العملية أيضاً وبدرجة الفعل الجيني المتحكم في الصفة.

٢. إذا كانت كروموسومات الأبوين مختلفة من حيث الشكل المورفولوجي فيمكن تمييز الهجين عن طريق الفحص السيتولوجي Karyotype analysis، لكنها عملية صعبة. ويوضح جدول رقم (٦-٢٦) أعداد الكروموسومات في بعض الهجن الجسدية. ومن الجدول يلاحظ أن النباتات الناتجة من الدمج بها تباين كبير في أعداد الكروموسومات وغالباً ما تحتوي على عدد من الكروموسومات أكبر من العدد الكلي للأبوين. يرجع ذلك لحدوث دمج لأكثر من بروتوبلاست خليتين معاً والذي قد يتبعه عدم اتزان في الانقسام الخلوي، أو بسبب الاختلاف في سرعة تضاعف الـ DNA للأبوين بعد الدمج، بالإضافة إلى تأثير زراعة الأنسجة نفسه على حدوث تباين وراثي.

٣. أما الطريقة الأكثر دقة فهي التحليل الإنزيمي Isoenzyme analysis وأساس هذه الطريقة أن للإنزيم تتابع محدد من الأحماض الأمينية. ويكون هناك فرق طفيف جداً بين الأنواع في هذا التتابع لكنه كاف لإظهار الفرق بينهم، ويتغير سلوك البروتين أثناء هجرته عند تعرضه لفرق جهد كهربائي electrophoresis حيث يتم الحصول على حزم مختلفة بعد الصبغ بالصبغات الخاصة المميزة لكل إنزيم. وقد يحتوي الهجين على حزم جديدة لم تكن موجودة في أي من الأبوين. ومن

- الإنزيمات التي تستعمل غالباً لتحديد التهجين *alcohol* و *peroxidase* و *esterase* و *dehydrogenase*. لكن تبدو مشكلة الاعتماد على هذه الطريقة في اختلاف تركيب الإنزيم باختلاف النسيج واختلاف مرحلة تطور النبات نفسها.
٤. الاعتماد على وجود مركبات ثانوية مميزة لأب معين.
٥. وجود ظاهرة قوة الهجين *heterosis* فعلى سبيل المثال عند نجاح التهجين الجسدى بين *Datura innoxia* المميزة بعدم وجود الكلوروفيل و *D. sanguinea* المميزة بوجود الكلوروفيل يلاحظ أن النسل يمتاز بقوة النمو حتى على مستوى الخلايا.
٦. أما الطرق الأكثر دقة فهي المعتمدة على التقنيات الجزيئية *Molecular techniques* والتي تسمى تهجين *DNA hybridization technique*.

جدول ٦-٢٦: أعداد الكروموسومات فى بعض الهجن الناتجة عن دمج البروتوبلاست (Chawla, 2000).

النوعان الداخلان فى التهجين وعدد كروموسومات بهما	عدد كروموسومات الهجين
<i>Brassica olerace</i> (2n=18) X <i>B. campestris</i> (2n= 18)	تباين واسع
<i>B. napus</i> (2n= 38) X <i>B. juncea</i> (2n= 36)	تباين واسع
<i>Datura innoxia</i> (2n= 48) X <i>D. stramonium</i> (2n= 24)	٧٢، ٤٨، ٤٦
<i>Nicotiana glauca</i> (2n= 48) X <i>N. glauca</i> (2n= 24)	٥٨ - ٥٠
<i>N. glauca</i> (2n= 48) X <i>N. glauca</i> (2n= 24)	٩٦
<i>N. glauca</i> (2n= 48) X <i>N. glauca</i> (2n= 24)	٧٢
<i>Lycopersicon esculentum</i> (2n= 24) X <i>L. peruvianum</i> (2n= 24)	٧٢
<i>Petunia parodii</i> (2n= 48) X <i>P. hybrida</i> (2n= 14)	٤٨-٤٤
<i>Solanum tuberosum</i> (2n= 24,48) X <i>S. chacoense</i> (2n= 14)	٦٠

الفصل السابع

التغيرات المظهرية والوراثية في مزارع الأنسجة

تتوقف الصفات المظهرية للكائن الحي والتي تعرف بالطرز المظهرى Phenotype بصورة أساسية على التركيب الوراثى Genotype أى الطرز الوراثى لهذا الكائن، وكذلك العوامل البيئية. لكن لا يتوقف الأمر عند هذا الحد بل من المعروف أن هناك تفاعل واضح بين التركيب الوراثى والظروف البيئية المختلفة المحيطة بالكائن. ويؤدى التفاعل بين العوامل الوراثية والبيئية فى النهاية إلى ظهور طرز مظهرية متباينة فى الكائن. ويطلق على السلسلة المعقدة من عمليات التطور اللازمة لتحويل الصفة الوراثية إلى صفة مظهرية Epigenotype. وقد أطلق على النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة فى بداية الأمر true-to-type بمعنى أن النباتات مطابقة تماماً للنبات الأم.

لكن فى السبعينيات والثمانينيات من القرن الماضى لاحظ البعض وجود تباين بين النباتات المستولدة فى مزارع الأنسجة، وكذلك بينها وبين النبات الأم. وعندها استهل كثير من العلماء دراسة هذا الأمر والتفكير فى استغلاله بطريقة إيجابية. فمن وجهة رأى علماء النبات يعتبر هذا التباين الطريقة السهلة لدراسة النواحي الوراثية للخلية الجسدية. رجب هنا أن يتم التفريق بين variant والذى يعنى أى تغير فى الطرز المظهرى بصرف النظر عن سببه وفى الغالب لا يتم توريثه بطريقة مندلية و mutation والتي تعنى تغيير ثابت فى التركيب الوراثى للفرد والذى قد يستوضح من الشكل المظهرى، قد لا يعبر الشكل المظهرى عنه فى بعض الحالات كبعض الطفرات الموضعية. ولعل من أهم صفات الطفرة انتقالها للنسل بالتكاثر الجنسى، وكذلك وجود بعض الدلائل الجزيئية المرتبطة بها (Jayasankar, 2005).

ولقد طورت العديد من الاستراتيجيات للتحقق من وجود التباين في النباتات المستولدة اعتماداً على الصفات المظهرية والتحليل السيتولوجي لفحص عدد الكروموسومات وكذلك تركيبها، بالإضافة إلى المشابهات الإنزيمية. وحديثاً تستعمل الطرق المعتمدة على الإحصائية الجزيئية مثل Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) و amplified fragment length polymorphism (AFLP) و Restriction fragment length polymorphism (RFLP).

وكانت أول ملاحظة تاريخية لوجود تباين في بعض الصفات الكمية لنباتات قصب السكر الناتجة من زراعة الأنسجة في سنة ١٩٦٩ على الرغم من تمتع تلك الصفات بدرجة كبيرة من الثبات الوراثي. وقد لاحظ (Heinz & Mee 1971) وجود تغييرات كبيرة في عدد الكروموسومات متوافقة مع حدوث اختلافات مظهرية وإنزيمية في النباتات الناتجة من زراعة الخلايا. وقد أظهرت بعض النباتات المتكشفة معدل أكبر من التفرع والاستطالة مع معدل بطئ من النمو. كما سجلت في السبعينيات من القرن الماضي اختلافات في النباتات المستولدة من نباتات الراي rey تضمنت نباتات خالية من التوروفيل albino وتباين في شكل الأوراق وقوة النمو وأيضاً تلازمت تلك الاختلافات مع تباين في عدد الكروموسومات. وفي سنة ١٩٧٦ اقترح Skirvin & Janick إمكانية استخدام هذا التباين في النباتات المستولدة في التحسين الوراثي للحصولات البستانية.

وكان (Larkin & Scowcroft 1981) أول من أطلق مصطلح somaclonal variation على التباين الموجود في النباتات المستولدة من الأنواع المختلفة من زراعة الأنسجة سواء المستخدم فيها أجزاء نباتية خضدية أو جنسية، وإن كان البعض يستخدم مصطلح gametoclone لوصف التباين الموجود في النباتات المستولدة من الأنسجة الجنسية. وباختصار تقود زراعة الأنسجة معملياً إلى إظهار تباين كان موجود أصلاً في الأجزاء النباتية التي استعملت في الإكثار أو استحداث تغييرات وراثية أو مظهرية لم

تكن موجودة أصلاً بالنبات الأم. والجدير بالذكر أن نسبة عالية من هذه التغييرات تحدث تلقائياً وبدون تدخل خارجي، كما أنه من الصعب توجيهها لتأخذ مساراً محدداً بعينه. ويعد هذا أحد عيوب الاعتماد على هذا التباين في التحسين النباتي. ولا تقتصر التغييرات الوراثية الحادثة أثناء الإكثار الخضري على مزارع الأنسجة بل تحدث في الطبيعة أثناء الإكثار التقليدي صوراً مشابهة من التباين، فمثلاً وجدت بعض النباتات المتضاعفة الثلاثية بين النباتات الناتجة من إكثار *Saintpaulia ionanth* أو *Begonia x hiemalis* عن طريق تكوين براعم عرضية على الأوراق (Mohan, 1997).

ويقسم التباين الحادث في زراعة الأنسجة إلى نوعين، الأول الوراثي genotype variation وهو تغير ثابت ودائم في المادة الوراثية ويتم توريثه إلى النسل الناتج بالتكاثر الجنسي. وينشأ ذلك النوع من التباين نتيجة لحدوث طفرات في المادة الوراثية ويتبع توريثه من جيل لآخر القواعد الوراثية المعروفة. وهذا النوع من التغييرات يكون مفيد عن طريق إكثار النباتات المنتخبة من الزراعة المعملية وتسويقها تجارياً سواء عن طريق البذور أو بالإكثار الخضري. لكن ليس من السهل دوماً عزل الطفرة المفيدة الناتجة من زراعة الأنسجة خاصة إذا كانت الطفرة المرغوبة متنحية. كذلك فإن تعبير بعض الطفرات في النسل الناتج يرتبط بالظروف البيئية المحيطة. ويتطلب التعرف على الطفرات الدقيقة micromutations بعض الطرق الخلوية الدقيقة والتقنيات الأخرى.

ويشير Bhojwani & Razdan (1996) إلى أن أغلب التغييرات الوراثية الثابتة في النباتات المستولدة في مزارع الأنسجة تقع في المادة الوراثية في النواة لكن لا يمنع ذلك حدوث بعضها في المادة الوراثية السيتوبلازمية. أما النوع الآخر من التغييرات فيعرف بالتباين المظهري أو البيئي phenotypic or environmental variation وهو غير ثابت ويحدث غالباً نتيجة تغير في الظروف البيئية ولا يتم توريثه للنسل الناتج

بالتكاثر الجنسي. هذه التغييرات الوراثية المظهرية قد تكون نتيجة تغير مؤقت في الظروف البيئية أو تغيير مؤقت في العوامل الوراثية حيث تؤدي بعض الظروف البيئية كمنظمات النمو أو الظروف التي كان ينمو فيها النبات قبل استعماله كمصدر للتكاثر إلى تنشيط بعض العوامل الوراثية - التي تكون في العادة غير نشطة- للتعبير عن نفسها ويطلق على هذه الظاهرة التباين المؤقت وتسمى Epigenetic. وفي كثير من الحالات يمكن استثمار تلك التغييرات المؤقتة على أساس أن النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة هي منتج نهائي، فعلى سبيل المثال يلاحظ زيادة كبيرة في معدل تفريع بعض نباتات الزينة عقب إكثارها معملياً، وعليه تباع هذه النباتات في هذه الصورة الجذابة (George, 1993).

وعموماً تحدث التغييرات الثابتة أو العكسية بنسب متباينة لكن غالباً تكون عالية في بعض أنواع مزارع الأنسجة، فالتكشف غير المباشر يؤدي إلى حدوث معدل أعلى من التباين بالمقارنة مع المباشر. وعلى هذا فإنه يتطلب استخدام أنسجة وطرق زراعة تقلل بقدر الإمكان من تلك التغييرات إذا لم يكن الغرض من الإكثار الدقيق إحداثها لاستخدامها في برامج التربية. وعلى الرغم من أهمية إنتاج نباتات مطابقة للصنف في برامج الإكثار التجاري فإنه قد يسمح بمعدل تباين منخفض نسبياً يتراوح بين ٣ و ٥%، وربما يرتفع إلى ١٠% على سبيل المثال في الإكثار التجاري للموز والذي يمكن تمييز ٦-٣٨% من النسل الناتج في مزارع الأنسجة بتغييرات مظهرية (Sahijram et al., 2003).

ومن المعروف أن طرق الإكثار التي ينتج منها عدداً كبيراً من النباتات تؤدي إلى حدوث نسبة عالية من التباين. ولذا ينصح بإعادة تكوين المزرعة من جديد بدءاً من النبات الأم بدلاً من استمرار تقسيم ونقل المزرعة المتكونة للحد من هذا التباين. ويضيف (Kaeppler et al., 2000) أن آليات حدوث التغييرات الثابتة أو المؤقتة تسبب انخفاض

قوة نمو المزرعة ومعدل التكشف. ولعل تدهور صحة المزرعة المرتبط بزيادة عمرها عائقاً أمام إنتاج النباتات المحورة وراثياً. وعموماً تتعدد صور الاختلافات الوراثية الحادثة في زراعة الأنسجة حيث تتضمن حالات التعدد الكروموسومى وكذلك التغيرات الكروموسومية التركيبية بالإضافة إلى الطفرات العاملة الجينية. ومن أمثلة التباين الذى سجل فى أنواع مختلفة من زراعة الأنسجة (شكل رقم ٧-١).

١. التباين فى حجم الخلايا، سرعة النمو، اللون محتوى الخلايا من المواد الثانوية.
 ٢. التباين فى الصفات الظاهرية للنباتات المستولدة من ناحية شكل الأوراق، طبيعة النمو، نظام التفريع، وضع الأزهار على النبات، وكثير من هذه التغيرات مرغوبة خاصة فى العديد من نباتات الزينة.
 ٣. التباين فى المقاومة لبعض ظروف الإجهاد البيئى abiotic أو الإحيائى biotic.
 ٤. التباين فى الاحتياج لمنظمات النمو بعد عدة مرات من الزراعة.
- وتشير كثير من المراجع إلى عشوائية التغيرات فى مزارع الأنسجة. لكن يبدو أن هذه الفرضية غير دقيقة فمع استعمال الطرق الجزيئية الحديثة أمكن التحقق من حساسية مواقع محددة فى الجينوم للإجهاد الحادث فى مزارع الأنسجة بدءاً من مرحلة التأسيس حتى الأقامة (Thomas et al., 2002). وعموماً يتضح أن التباين الحادث فى زراعة الأنسجة أصبح أداة فعالة فى أيدي مربى النبات لاستخدامها فى تحقيق الكثير من أهداف برامج التربية.

وقد أوضح Jain (2001) و Predieri (2001) العديد من الأمثلة لنباتات أمكن إنتاج أصناف تجارية منها بتحسين صفاتها المحصولية أو المقاومة لبعض الأمراض أو الحشرات أو الإجهاد البيئى بالاعتماد على somaclonal variations بصورة أساسية أو بالدمج بينها وبين بعض الطفرات سواء الكيميائية أو الطبيعية، وبهذا يمكن القول أن علم زراعة الأنسجة والهندسة الوراثية من أحدث العلوم التى يتركز عليها علم تربية النبات.



شكل ١-٧: التباين في الكالس الناتج من نفس الجزء النباتي في *Ziziphus mauritiana* (أ)، ونباتات قرنفل خالية من الكلوروفيل (ب)، وزيادة عالية في تفريع القرنفل أعلى الساق مع نمو طبيعي لبعض النباتات في نفس المزرعة (ج)، ونباتات التين وقد غطتها زوائد شمعية بيضاء مع ضعف النمو وفي نفس المزرعة نباتات عادية (د).

ويمكن توضيح مميزات وعيوب somaclonal variation فى تربية النبات فى الجدول التالي:

المميزات	العيوب
قد يحدث التباين فى بعض الصفات المحصولية	ربما لا يستفاد منها فى الصفات الصفات الكمية
يحدث التباين بمعدل عالي	حدوث تغيرات عكسية لبعض الصفات
قد يكون التباين فريداً ولا يمكن الحصول عليه بالطرق التقليدية	التباين الحادث عشوائى وغير موجه
انتخاب نباتات متحملة للإجهاد البيئى والبيولوجى	عدم الثبات الوراثى أحيانا
تقصير برنامج التربية	ضرورة إجراء تقييم حقلى دقيق

أولاً: التباين المؤقت Epigenetic

من المعروف أن جميع العمليات الحيوية فى الخلية تتم عبر بروتين تم تخليقه فى السيتوبلازم كترجمة للحامض النووى الرسول mRNA الذى تخلق بدوره عبر نسخ DNA. وقد أمكن فى السنوات الأخيرة التوصل إلى تتابع الحامض النووى للكروماتيدات، وكان السؤال لماذا يلاحظ وجود تباين واضح فى بعض صفات التوائم المتشابهة رغم تركيبهم الوراثى المتطابق. وهذا ما أرجعه العلماء إلى ما يسمى الوراثة فوقية epigenetic والتى ترجع بدورها إلى ذلك التتابع من الحامض النووى والذى يطق عليه إن صح التعبير الحامض النووى الخردة "junk DNA" والذى لا يتم نسخه إلا فى حالات قليلة. وهنا لا بد من الإشارة أن جزء بسيط من الحامض النووى فى الكائنات الراقية يتم نسخه وترجمته إلى بروتين، أما باقى التتابعات والتى أطلق عليها junk DNA فقد تراكمت كما يرى البعض عبر عمليات التطور. وللتباين الوراثى فى

مزارع الأنسجة أهمية خاصة في دراسة epigenetic ودورها في تنظيم عمل الخلية. وقد تم التأكد بالفعل من دور هذا الجزء من الحامض النووي في تنظيم عمل الخلية من خلال تحكمها في نشاط بعض الجينات. ويتضمن ذلك مثيلة الحامض النووي أى إضافة مجموعة ميثيل وإضافة مجموعات الـ acetyl للـ histone "histone acetylation" وغيرها بحيث لا تمس بأى حال تتابع الحامض النووي. والتغيير فى هذا النظام يتم توريثه للنسل لكن حتى الآن هناك نظريات هل هذا جزء من النظام التقليدى لتخليق البروتين من الحامض النووي "DNA/RNA/Protein" أم هو نظام آخر مستقل، وفى الواقع فإن الحديث عن هذا النظام معقد وليس هنا مجال لشرحه، ويمكن الرجوع إلى بعض المراجع المتخصصة.

من المسلم به احتواء كل خلية من خلايا الكائن الحى على عدد كبير من المعلومات الوراثية التى تتحكم فى صفاته، لكن يلاحظ أن هذه العوامل لا تعبر عن نفسها كل الوقت أو بنفس الدرجة. بمعنى أن هناك عوامل لا تعبر عن نفسها إلا فى مرحلة معينة من العمر أو تحت ظروف بيئية خاصة تعمل على استحداث هذه العوامل. أى أن الظروف البيئية تؤثر فى تعبير بعض الجينات عن نفسها فيتتم نسخها وترجمتها ومن ثم تتخلق بروتينات جديدة تقود فى النهاية إلى تغيير فى الشكل المظهرى للنبات وبزوال العامل المستحث inducer يتوقف تعبير هذا العامل الوراثى وتتغير الصفة المظهرية تبعاً لذلك. وقد يتم هذا التوقف سريعاً وبمجرد زوال العامل المستحث أو يمتد تأثيره بعض الوقت كان يمتد إلى جيل تالى قبل أن يتم التحول فى الصفة المظهرية. ويسمى هذا النوع من التغيير الوراثى الذى يختفى بزوال العامل المستحث بـ Epigenetic. ومن الأمثلة على ذلك عمليات مثيلة وتضاعف amplification الحامض النووي فى مزارع المعلق الخلوى لخلايا الجزر، فأتثناء الطور اللوغارىتمى يقل معدل التكبير وتزيد الميثيلة. وربما يشير ذلك إلى حدوث إعادة فى ترتيب عوامل epigenetic ويمكن القول بأن هذا مصاحب لتكوين الكالس من المستأصل النباتى. أما أثناء طور الثبات وهو المصاحب

لتكوين الجذور فيلاحظ زيادة في معدل التضاعف وانخفاض معدل الميثلة. ويمكن باستعمال منظمات النمو خاصة الأوكسينات استحثاث عمليات الميثلة (Loschiavo *et al.*, 1989) و (Arnholdt-Schmitt, 1993).

وربما يحدث خلل أثناء إعادة الترتيب بسبب epigenetic حيث يظهر جلياً في صورة somaclonal variations. ولا بد من التأكيد على أن هذا النوع من التغييرات لا ينتج عنه أى تغيير فى تتابع الحامض النووى أو التغييرات الكروموسومية المعروفة (Kaeppler *et al.*, 2000). وبالطبع فإن التغييرات الوراثية الثابتة والتي يتم نقلها بالإكثار الجنسى تكون ذات الأهمية الأكبر فى برامج تربية النبات على العكس من التغييرات المؤقتة. لكن يصعب فى معظم الأحيان الفصل بين النوعين دون إجراء تلقيح ذاتى للنباتات الناتجة (لكن ربما تكون هذه النباتات عقيمة) ودراسة توريث الصفة فى النسل الناتج. ومن أمثلة هذا النوع من التباين فى مزارع الأنسجة ما يلى:

١. النباتات الناتجة من زراعة القمم الميرستيمية أو من تكوين البراعم العرضية للحصول على نباتات خالية من الفيروس. حيث تختلف تلك النباتات فى مظهرها الخارجى عن النباتات الأم المصابة بالفيروس.
٢. قد يسبب استعمال بعض المركبات مثل السيتوكينينات تغيير الصفات المظهرية كسُمك الأفرع، ونظام التفرع، وغيرها من الصفات.
٣. تعمل الظروف المعملية من ارتفاع الرطوبة وانخفاض الإضاءة ونوعيتها على استحداث تغييرات فى الشكل الظاهرى للأوراق، وآلية عمل الثغور. وكذلك التغير الظاهرى فى الأفرع المنزرعة أو النباتات المستولدة نتيجة ظاهرة التميؤ الزجاجى.

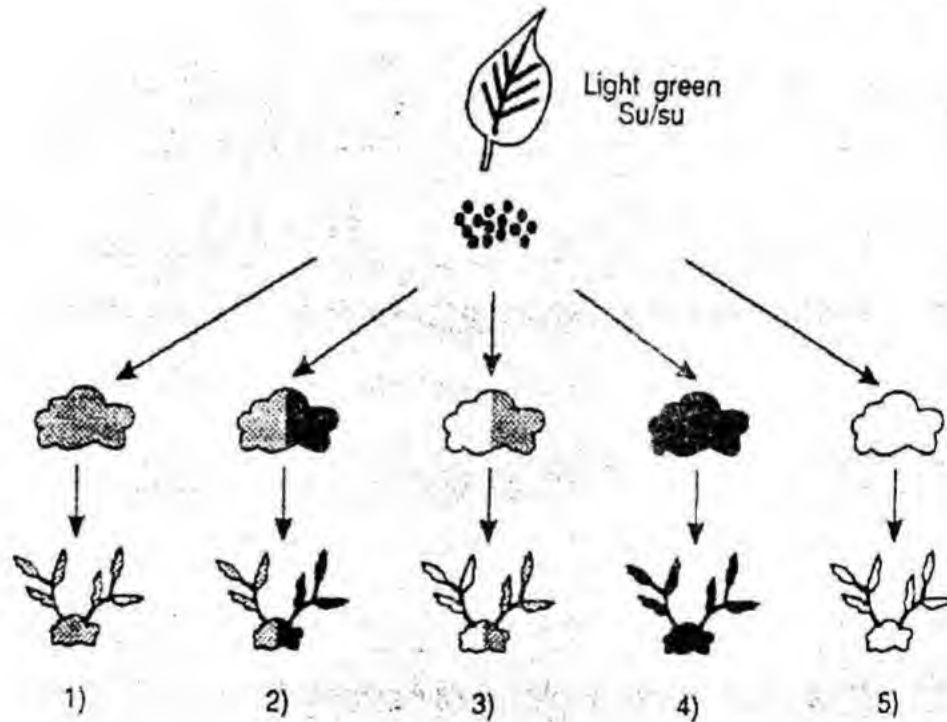
ثانياً: التغييرات الوراثية المورثة Mutations

يقال أن الخلية بها طفرة عند حدوث تغيير فجائى فى الجينوم بشرط توريث هذا التغير للنسل. ويسهل ملاحظة هذا الخلل فى النباتات الثنائية كالذرة على العكس من لنباتات متعددة المجموعات الكروموسومية كالقمح فربما لاتسبب الطفرة تغيير فى الشكل

المظهري. فعلى سبيل المثال وجد (Lee & Phillips, 1987) أن كل نبات ذرة ناتج من مزرعة عمرها ٨ شهور يحتوى على معدل ١.٢٣ طفرة فى صفات وصفية أى تسبب تغيير ثابت فى الطرز المظهري انتقل لعدة أجيال من النسل بالتكاثر الجنسي. وقد سجلت العديد من التغيرات الوصفية فى كثير من الصفات مثل طول النباتات والكتلة الحيوية ومحصول الحبوب وغيرها. وبالنسبة للوراثة لعدد من النباتات فى مزارع الأنسجة تبين وجود بعض الطفرات التى تسمى العديد من الصفات الكمية أيضاً (Kaeppler *et al*, 2000). وربما تحدث الطفرة نتيجة تغير بسيط فى موضع أو تركيب جين واحد أو أكثر. وقد تكون هذه التغيرات فى العدد أو التركيب الكروموسومى مسببة صور عديدة من الاختلافات الوراثة. وتحدث التغيرات الوراثة بصورة طبيعية فى كثير من الكائنات لكن بمعدل بسيط. لكن يؤدى الإكثار المعمل على كما سبق الذكر - إلى زيادة معدل حدوث أو ظهور هذه التغيرات زيادة كبيرة جداً، أو على الأقل زيادة فرصة ظهورها. ويرجع ذلك للأعداد الهائلة من الخلايا الموجودة فعلى سبيل المثال تحتوى كل ١٠٠ مل من معلق خلايا الدخان على 1×10^6 خلية (George, 1993). وعلى الرغم من المعدل العالى لحدوث تلك التغيرات فى مزارع الأنسجة فإن العديد منها لا يتم ملاحظتها فى النباتات الناتجة، إما لأن هذه الطفرات تكون مميّنة أو لأنها تمنع تكثف الخلية المحتوية عليها أو تؤدى إلى ضعف النمو الخضري للنبات المتكثف بمعنى أن لها شكل ظاهري معاكس فى النمو وبذلك تستبعد من العشيرة.

وفى المقابل فإن بعض التغيرات الحادثة أثناء زراعة الأنسجة مفيدة وهامة بالنسبة لمربي النبات بطريقة مباشرة أو غير مباشرة. فقد يكون التركيب الوراثى المستحدث مهماً كسلالة خلوية Cell line لإنتاج مادة ثانوية كالقلويدات أو الجليكوسيدات معملياً أو لإجراء التحويل الحيوى لبعض المركبات الأولية إلى مواد ثانوية وهى المواد ذات الاستخدام الطبى أو الصناعى. والتغيرات فى الشكل الظاهري للنباتات المستولدة شائعة الحدوث ليس فقط فى حالة التكثف غير المباشر من الكالس والمعلق الخلوى بل

في الكشف المباشر ومزارع البروتوبلاست أيضاً. وتشير النتائج التي لوحظت في نباتات الدخان المتكشفة باستخدام مزارع البروتوبلاست من أوراق نباتات لونها أخضر مصفر تركيبه الوراثي خليط Su/su حيث أن الطراز su/su لونه أخضر داكن أما الطراز Su/Su البينو إلى حدوث تغيرات وراثية أثناء عزل وزراعة البروتوبلاست. ويوضح (Lorz & Scowcroft 1983) في الشكل رقم (٧-٢) الحصول على كالسات تكشفت منها نباتات خضراء مصفرة، خضراء داكنة، بيضاء، نباتات خضراء داكنة + خضراء مصفرة، نباتات خضراء مصفرة + البينو.



شكل ٧-٢: يوضح تكشف نباتات متباينة وراثياً من كالسات مصدرها بروتوبلاست خلايا أوراق الدخان ذو التركيب الوراثي Su/su حيث تم الحصول على خمسة طرز من الكالسات هي: 1) Su/su , 2) $Su/su + su/su$, 3) $Su/Su + Su/su$, 4) su/su and 5) Su/Su . (Lorz & Scowcroft, 1983)

مصدر التغيرات الوراثية في زراعة الأنسجة

قد يرجع التباين الحادث في زراعة الأنسجة جزئياً أو كلياً إلى التغيرات الموجودة في النبات الأم مصدر الخلايا أو الأجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة.

تحتوى خلايا بعض النباتات خاصة تلك التى تعرف بـ polysomatic على طرز وراثية متباينة وذلك على الرغم من التشابه المظهرى فيها، وتكثر هذه الظاهرة فى بعض النباتات كالدخان والشعير (Jayasankar, 2005). وقد حدث جدل حول ما إذا كان هذا النوع من التضاعف نتيجة أم سبب للتكشف، ويخلص (Bhojwani & Razdan 1996) إلى أن هذا التضاعف يمنع الخلية التى سلكت مسلك الكشف من الانقسام مرة أخرى تحت الظروف الطبيعية. وربما تحتوى بعض خلايا النبات الأم على طفرات لكن لا تكون واضحة فى الشكل الظاهرى. فعلى سبيل المثال قد تكون إحدى خلايا الورقة محتوية على طفرة فى أحد الجينات المسئول عن تكوين اللون فى الأزهار، أو تكون أحد خلايا عنق الورقة المستعملة كمصدر للمستأصل المنزوع بها تضاعف كروموسومى.

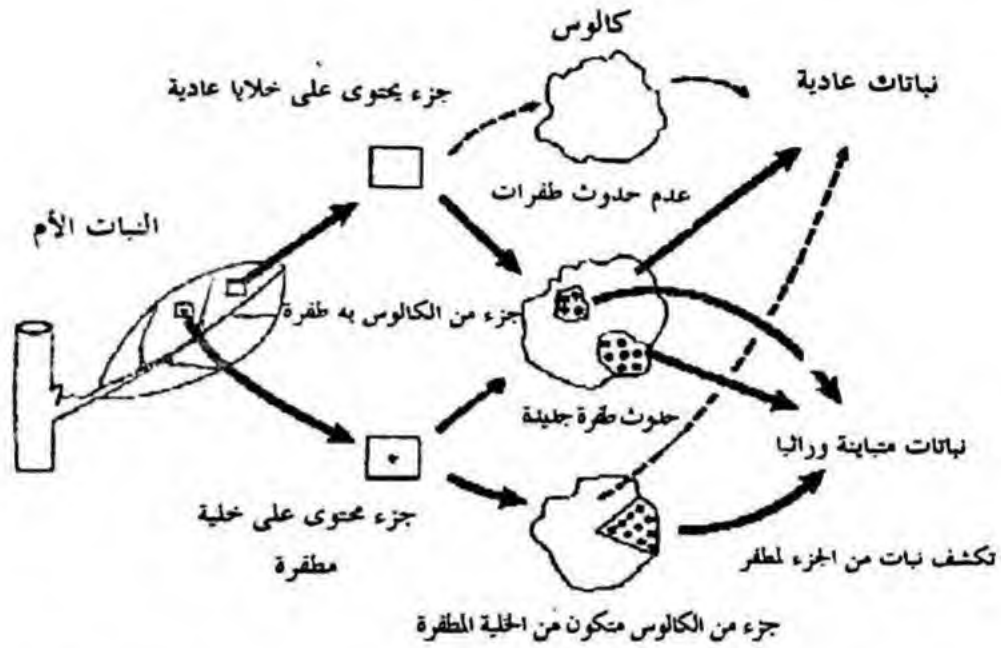
وفى الغالب لا تلاحظ تلك الاختلافات فى الظروف الطبيعية لكن إذا قدر لهذه الخلية أن تتكشف إلى نبات أو على الأقل المشاركة فى تكوين النبات المتكشف فإن هذه الطفرة ستتضح فى الشكل الظاهرى للنبات المستولد. وأمكن بالفعل إنتاج أصناف جديدة من نباتات الازاليا بزراعة الأجزاء الملونة من بتلات أحد الأصناف ويرجع ذلك لكون الجزء الملون وعلى العكس من باقى البتلة به تضاعف كروموسومى (De Schepper *et al.*, 2004). لكن الكثير من التغيرات الحادثة فى النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة تكون مستحدثة أى غير موجودة بالنبات الأم. وتحدث معظمها فى المراحل الثلاث الأساسية من زراعة الأنسجة. فقد يكون ذلك أثناء مرحلة تأسيس المزرعة وغالباً ما يتضح ذلك فى عزل البروتوبلاست دون غيره من أنواع زراعة الأنسجة، أو أثناء مرحلتى النمو والإستيلاد، وتحدث كثير من هذه التغيرات فى هاتين المرحلتين حيث يحدث انقسام سريع جداً فى الخلايا بالمقارنة بالمعدل العادى من الانقسام. ويمكن توضيح مصدر التباين فى زراعة الأنسجة إلى ما يلى:

١. التغيرات الراجعة إلى النبات الأم

يقدر (Neumann et al., 2009) متوسط عدد الخلايا بالمستأصل النباتي بين ١٠.٠٠٠ إلى ١٥.٠٠٠ خلية أو أكثر. وربما يفترض تشابه التركيب الوراثي لجميع خلايا النسيج لكن من الثابت الآن وجود مجموعة من الخلايا الخضرية ذات تركيب وراثي مختلف في نفس النسيج، وتتعاون كلا المجموعتين في تكوين أنسجة النبات والقيام بالوظائف المختلفة. ويشير (D'Amato 1980) أن حوالي ٩٠ % من النباتات الطبيعية مغطاة البذور تحتوى على تغيرات وراثية في خلاياها. وعلى هذا فإن معظم الخلايا في الأنسجة البالغة كخلايا النخاع والبشرة وغيرها تظهر مستويات مختلفة من التغيرات الوراثية. وعلى العكس من ذلك فإن الخلايا في القمم الميرستيمية تقع تحت نظام تحكم عالى يضمن الثبات الوراثي بدرجة عالية لكن أثناء التكشف يحدث هذا الخلل في بعض الخلايا، وربما يصل التضاعف الكروموسومى في بعض الحالات إلى ثمان مرات. وقد يندرج ذلك التباين من تغير بسيط غير ملحوظ كتغير في بعض الصفات الفسيولوجية في الخلايا المشتركة في تكوين النسيج إلى تغير مورفولوجى واضح من اتحاد خلايا من نوعين مختلفين وهو ما يعرف بالكميرا. وبفرض أنه تم استعمال نسيج به كيميرا للإكثار النقي فممن المتوقع أن تكون النباتات المستولدة منه متباينة على أساس التباين الموجود في الخلايا التى تكشفت منها كما يتضح من شكل رقم (٧-٣). فربما تتكشف النباتات من نسيج واحد فقط من أو من النسيجين معاً.

كذلك الأمر فإن معدل التباين يكون عالى عند استعمال أنسجة بالغة متكشفة كمصدر للجزء المنزرع لأن بعض الخلايا المتكشفة والتى لها وظائف محددة يكون بها صور من التغيرات الكروموسومية العددية. حيث يحدث تضاعف في هذه الخلايا دون انقسام النواة أو تنقسم النواة لكن لا يحدث انقسام للسيتوبلازم ولا يتكون الجدار الخلوى وهو ما يعرف بالتضاعف الداخلى Endoreduplication. وتعرف الخلايا التى بها صور مختلفة من التضاعف الكروموسومى فى الأنسجة الجسدية Polysomaty or

Polysomatine. ويكثر وجود هذه الصور من التضاعف في الأنواع النباتية المتضاعفة مثل الأرز والدخان والبطاطس. وقد تحتوي الخلية أيضاً على عدد أقل من الكروموسومات بالمقارنة بالخلية العادية (التعدد الكروموسومي غير التام). ويعتبر الإكثار عن طريق مزارع البروتوبلاست أو الأجنة الجسدية طريقة فعالة للحد من النباين



شكل ٧-٣: مصادر النباين الوراثي في النباتات المتكشفة من زراعة الأنسجة (George, 1993).
بين النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة حيث يتكون النبات من خلية واحدة فيكون تركيبه الوراثي واحد (Neumann et al., 2009).

ومن الواضح أن من أسباب الخلل الكروموسومي الحادث أثناء الانقسام الميوزي هو فشل خيوط المغزل في التكون أو وجودها في أكثر من قطبين في الخلية. أو قد يحدث ذلك الخلل في عدد الكروموسومات نتيجة توقف الخلية عن الانقسام في طور G2 ثم دخول الخلية في مرحلة G1 دون إتمام الانقسام الميوزي العادي. وأحيانا يتلزم الكشف مع حدوث خلل في عملية الانقسام كحدوث أكثر من انقسام للسيتوبلازم أثناء انقسام الخلية. كما قد يحدث تضاعف للكروماتيدات أثناء الطور S من الانقسام الخلوي

تحدث انفصال لهذه الكروماتيدات. هذه الصور غير الطبيعية من الانقسام الخلوي غير شائعة الحدوث في الخلايا الميرستيمية والأنسجة المشتركة في الإكثار الجنسي، وذلك لميكانيكية عمل الخلية المحكمة في الظروف الطبيعية للمحافظة على ثبات تركيبها الوراثي. وإذا تم استعمال نسيج به خلايا تحتوي على إحدى هذه الصور من الخل الكروموسومي فيتوقع أن تحتوي الخلايا الناتجة بالانقسام وبالتالي النبيتات المستولدة من هذا النسيج على نفس الاختلافات الموجودة في النبات الأم بالإضافة إلى صور جديدة لم تكن موجودة في النبات الأم. ويمكن التعرف على هذه الاختلافات بمقارنة هذه النباتات مع الأم (راجع دورة الخلية بالفصل الأول).

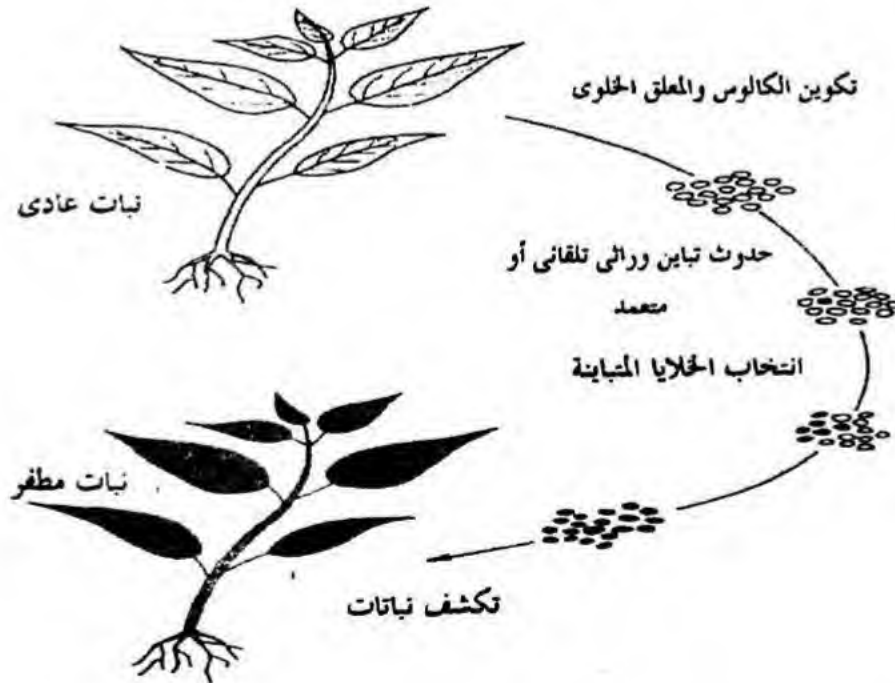
٢. التغيرات الراجعة إلى الجزء المنزوع

تحتوي بعض أجزاء النبات البالغ على خلايا بها صوراً من الطفرات الموضعية أو التضاعف الكروموسومي بنسب متباينة في الأنسجة المختلفة كما سبق ذكره. لكن يجب التنويه هنا إلى أن بعض الأنسجة تكون أكثر عرضة لحدوث اختلافات في العدد الكروموسومي دون غيرها. وتزيد نسبة هذه التغيرات في الأنسجة غير الميرستيمية أو غير الجنينية. ومن ثم يلاحظ أن أكثر أنواع الكالس ثباتاً من الناحية الوراثية هو الناتج من الأنسجة الميرستيمية وأجزاء البادرات حيث تكون معظم الخلايا في الحالة الميرستيمية وبالفعل أكدت كثير من الدراسات هذه الظاهرة (George, 1993). وهناك بعض الاستثناءات البسيطة كزيادة معدل التغيرات الوراثية في الكالس المتكثف من البراعم الجانبية لنباتات البطاطا الحلوة (Moyer and Collins, 1983). كما يستثنى من ذلك أنسجة الأوراق الفلقية لبعض الأنواع النباتية حيث تحتوي على نسبة عالية من التضاعف الكروموسومي مقارنة مع الأنسجة الأخرى. وقد كانت كل نباتات الأناناس المتكثفة من syncarp وهي (اتحاد عدد من المبايض مع بعضها) وكذلك تلك التي مصدرها slip السفقان الصغيرة التي تنمو تحت الثمار) متباينة، بينما انخفض هذا المعدل إلى ٧% فقط

من النباتات المستولدة من الكالسات التي مصدرها منطقة التاج (Wakasa, 1979). وكذلك كان العديد من النباتات التي مصدرها كالس من البذور متباينة على العكس من النباتات التي مصدرها كالس من النورات الزهرية. وفي العديد من الحالات وجد أن النبيتات المتكشفة من استعمال الأوراق الفلقية بينها تباين أكثر بالمقارنة مع استعمال الأوراق الحقيقية (Bhojwani & Razdan 1996).

٣. التغيرات الحادثة أثناء الزراعة

يرجع جزء كبير من التغيرات الوراثية الحادثة في زراعة الأنسجة إلى ظروف الزراعة نفسها التي تسبب تلك التغيرات والتي يمكن الاستفادة منها في الانتخاب والتحسين النباتي كما هو مبين في الشكل رقم (٧-٤) حيث من السهل التحكم في تلك الظروف وتوجيهها لإحداث معدل عالي من التغيرات الوراثية.



شكل ٧-٤: انتخاب نبات متباين وراثيا عن النبات الأم باستعمال الانتخاب المعمل لخللا حدث بها تباين أثناء الانقسام (Stafford & Warren, 1991).

أنواع التغيرات الوراثية في مزارع الأنسجة

١. التغيرات الكروموسومية العددية Numerical chromosomal aberrations

غالباً تكون الخلايا الميرستيمية الموجودة في الكالس أو معلق الخلايا متشابهة وثابتة وراثياً. لكن لوحظ أن زيادة فترة زراعة الخلايا في المعمل تسبب وجود مستويات متباينة من الحامض النووي في الخلايا الفردية ذات الفجوات الكبيرة ، والتي غالباً توجد طافية في المعلق. وعادة تحتوى تلك الخلايا البرانشيمية على حالات من التضاعف الكروموسومي مشابهة لتلك الموجودة في خلايا النبات العادي التي سبق ذكرها. وفي معظم الحالات لا تنقسم الخلايا التي بها تضاعف غير تام endopolyploid، لكن لو تم استحثاث هذه الخلايا للانقسام فإن مستويات مختلفة من التضاعف تتضح في النسل المستولد. وقد أتضح بالفعل أن مستوى endoreduplication في مزارع الأنسجة أكثر مما كان يعتقد.

لكن يبدو أن نوعية التغيرات ترتبط بشكل مباشر بنوع النباتات (Kaeppeler *et al.*, 2000) فقد سجلت معظم الأبحاث في نباتات الشوفان ارتباط كبير بين معدل التضاعف الكروموسومي والتغيرات في الشكل الظاهري للنباتات المتكشفة معملياً. وعلى العكس من ذلك كان معدل التضاعف أقل من الكسور الكروموسومية في نباتات الشعير. ورغم أهمية التضاعف التام في برامج التربية فإن عدم ثباته الوراثي يعيق الاستخدام الواسع له (Neumann *et al.*, 2009). ويلعب عمر المزرعة دوراً هاماً في مدى حدوث التغيرات الوراثية في الكالس والنباتات الناتجة. وبفرض أن خلية ما حدث بها تغير وراثي فإن احتمال انقسامها ومشاركتها في تكشف نباتات تعتمد على الظروف بالمزرعة.

من الطبيعي أن تتسبب التغيرات الوراثية في تقليل فرصة انقسام الخلايا في الظروف العادية. إلا أن الخلايا في زراعة الأنسجة لا تخضع لهذه القاعدة وتستمر الخلية

فى الانقسام ويتوقف ذلك على شدة التغيرات الوراثية الموجودة بالخلية. فالتغيرات الوراثية الشديدة قد توقف انقسام الخلية أو تقضى إلى إنهاء حياة الخلية أو عدم تكشفها. لكن تختلف صور التغيرات الكروموسومية العددية سواء كانت من النوع التام polyploidy أو غير التام aneuploidy حتى فى نفس التجارب المتشابهة تماماً. وبالطبع يصعب مع ذلك التنبؤ بالتغيرات الوراثية المتوقعة. ومن المعروف أن حالات التضاعف غير التام aneuploidy غير شائعة الحدوث فى الطبيعة إلا فى النباتات المتضاعفة بطبيعتها لكنها شائعة الحدوث فى زراعة الأنسجة، وبالفعل ظهرت حالات مختلفة من التضاعف فى العديد من النباتات الناتجة من زراعة أنسجة الدخان والجزر والفاول وكثيراً من نباتات الزينة. كما لوحظت حالات من التعدد غير التام فى النباتات المتكشفة من مزارع متوك البيتونيا والداتورة وغيرها من النباتات.

وقام (Ahmad et al., 2010) بدراسة عدد الكروموسومات فى مزارع المعلق الخلى وكذلك نباتات الكمون المستولدة منه وسجل تباين أعداد الكروموسومات بين ١٢ و ٢٨ كروموسوم على الرغم من العدد الطبيعى هو ١٤ كروموسوم. لكن كان أغلب النباتات والخلايا ذات أعداد طبيعة من الكروموسومات (شكل رقم ٧-٥). ويمكن إحداث التضاعف الذاتى بإضافة الكلوشيسين للنباتات مباشرة، فقد تم الحصول على ٤٨٠ نبات متضاعف من مزرعة خلايا إحدى الهجن النوعية فى الجنس *Saccharum* بإضافة ٥٠ ملجم/لتر من الكلوشيسين إلى بيئة النمو لمدة أربعة أيام. ومن المهم الإشارة إلى وجود حالات من التضاعف الذاتى الداخلى بمعنى وجود أشكال مختلفة من الأنوية غير كاملة بسبب تكوين أكثر من زوج من خيوط المغزل، ولمنظمات النمو دور مهم فى ذلك (D'Amato et al., 1980).

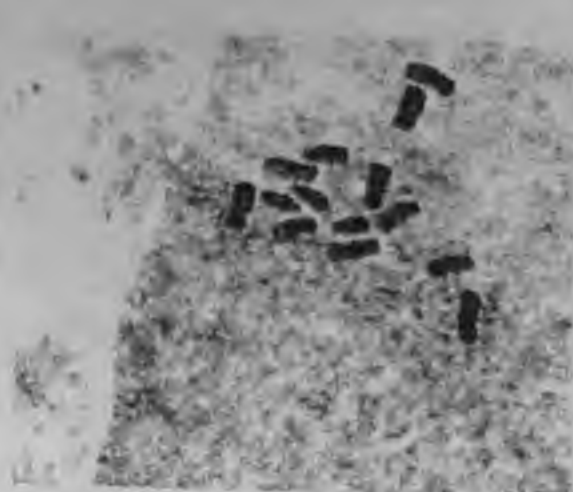
التغيرات الكروموسومية التركيبية Structural chromosomal aberrations

تتضمن التغيرات الكروموسومية العددية التي سبق الإشارة إليها أشار Lee & Phillips (1987) أن زراعة الأنسجة قد تؤدي إلى حدوث تغييرات كروموسومية تركيبية أي في تركيب الظاهري للكروموسوم شكل رقم (٦-٧). فأحيانا تحدث كسور يترتب عليها قد لأجزاء من الكروموسوم أو تغير في ترتيب أجزاء الكروموسوم بالنسبة لبعضها البعض إذا حدث إعادة التحام لهذه الأجزاء في غير ترتيبها الطبيعي أثناء انقسام الخلايا. وينتج عن ذلك صور مختلفة من التغيرات التركيبية. وقد وصف Larkin *et al.* (1985) التغيرات الكروموسومية التركيبية من نوع الفقد والانتقال والانقلاب وغيرها في ١٤ نوع نباتي. كما بين وجود تغييرات تركيبية في ١٧ نبات قمح سداسي منها ١٤ نبات تحتوي على تضاعف aneuploidy و ٤ نباتات euploid وذلك من بين ٥٥١ نبات تم اكتشافها. وقد درس Lee & Phillips (1988) طريقة حدوث هذه التغيرات باستفاضة وبينا أن التضاعف المتأخر في مناطق heterochromatin هو السبب الرئيسي في التباين الوراثي في الذرة، أما التباين في نباتات الفول *Vicia faba* فيرجع في الأساس إلى العناصر النقلة. لكن يجب الإشارة إلى أن فرصة الخلايا التي بها تضاعف كروموسومي للاشتراك في تكشف النباتات أعلى من الخلايا التي بها طفرات تركيبية. ويعتبر هذا من صور الانتخاب الطبيعي حيث تستبعد الخلايا التي بها طفرات لتقلل من نسبة إستيلاد نباتات متباينة وراثيا.

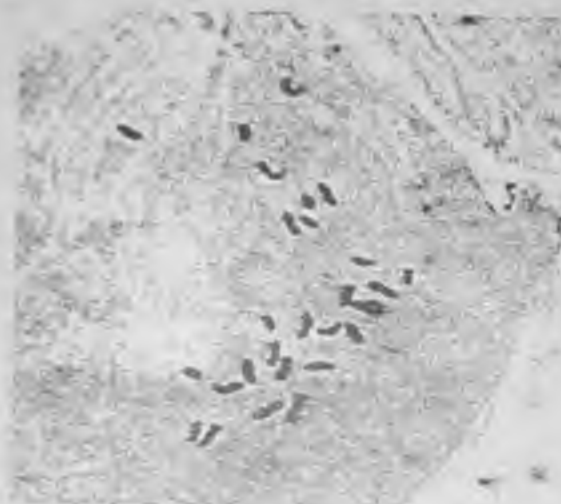
ومن صور التغيرات التركيبية التي وجدت أيضاً في زراعة الأنسجة انتقال جزء من أحد الكروموسومات إلى كروموسوم آخر ربما يكون غير الشبيه. كذلك حدوث كسر في منطقة السنترومير وبالتالي يتحول الكروموسوم الواحد إلى كروموسومين. وقد حظ أيضاً في بعض مزارع الأنسجة وجود الكروموسومات الحلقية أو الكروموسومات ثنائية أو متعددة السنترومير (Lee & Phillips, 1988).



خلية Aneuploid ($2n=12$)



خلية طبيعية ($2n=14$)



خلية Aneuploid ($2n=27$)



خلية بها تضاعف رباعي ($2n=28$)



شكل ٥-٧: بعض صور التغيرات الكروموسومية العددية في المعلق الخلوي بزراعة السويقة الجنينية العليا لنباتات الكمون (في الأعلى والوسط) والنباتات المستولدة (في الأسفل) Ahmad et al. (2010)



شكل ٦-٧: الكروموسومات المينورية. الفصح الساعية أحذور الفصح $2n = 6x = 42$ على اليسار. وعلى اليمين يتضح تأثير زراعة الأسحة على الهيئة الكروموسومية لنفس النبات وذلك بفقد جزء كبير من أحد انزع الكروموسوم المشار إليه بالسهم السفلي بالمقارنة مع الكروموسوم النظير الطبيعي المشار إليه بسهمين (Lee & Philips, 1987).

ويمكن بطرق الفحص السيتولوجي تحديد بعض هذه الاختلافات، لكن هناك تغيرات أخرى تحدث بالجينوم ولا تكون بهذه الدرجة من الوضوح وتتطلب طرق فحص أكثر تخصصاً للكشف عنها مثل (RFLP).

٢. التغيرات في العناصر النقلة Transposable elements

كما سبق القول هناك بعض التغيرات الوراثية المخفية والتي لا تتضح بالفحص الخلوي كتنشيط أو إعادة تغير موضع العناصر النقلة والتي تؤدي إلى حدوث طفرات في بعض الجينات. والعناصر النقلة عبارة عن تتابعات وراثية لها القدرة تحت ظروف معينة على التحرك من موقع لآخر داخل نفس الكروموسوم أو كروموسوم آخر. وهذه العناصر مختلفة الأنواع وليست نوعاً واحداً. ويسبب انتقال هذه العناصر من موضع إلى آخر تنشيط أو تغيير غير ثابت غالباً في فعل بعض الجينات المجاورة لها أو التي تولج بداخلها. ويتوقف تأثير العناصر النقلة في إحداث التباين في الشكل الظاهري على عدد المواقع النشطة لها. وبجانب التأثير المثبط المؤقت لهذه العناصر فإنها قد تؤدي إلى إحداث تضاعف في أجزاء من الحامض النووي وإعادة ترتيب الجينوم كحدوث انقلاب أو فقد لجزء من الكروموسوم.

وتؤدى ظروف زراعة الأنسجة إلى تنشيط هذه العناصر فقد أشار Hirochika *et al.* (1996) أن قدم عمر مزارع خلايا الأرز يؤدى إلى تنشيط ثلاث عائلات من العناصر النقلة هي (*Tos10*, *Tos17*, and *Tos19*) وبزيادة نشاطها ارتفع معدل نسخ الحامض النووى. لكن تظل ميكانيكية استجابتها وتنشيطها فى زراعة الأنسجة غير معروفة، فعلى الرغم من المعدل المنخفض لتنشيط العناصر النقلة فقد تبين أن العناصر النقلة *Spm/En* و *Ac-Ds* المعقدة فى الذرة تنشط بمعدل عالى عقب زراعة أنسجتها بالمقارنة مع النباتات الناتجة من البذور (Peschke & Phillips, 1991 و Peschke *et al.*, 1991) وعلى العكس من بعض الدراسات الأخرى لم يكن هناك ارتباط بين تنشيط هذه العناصر وميثلة الحامض النووى. وأيضاً لم يبين الفحص الخلوى أى ارتباط بين تنشيط العناصر النقلة فى النباتات المستولدة والكسور الكروموسومية. ويعتقد أن تلك العناصر النقلة لها دور فى الكشف. وبصفة عامة التغييرات التركيبية أكثر حدوثاً فى زراعة الأنسجة من التغييرات العددية. ولأن التغير فى الشكل الظاهرى يكون أكثر تأثراً بالتغييرات التركيبية عن العددية فإن الاعتماد على التغييرات العددية كدليل للتغير الوراثى فى زراعة الأنسجة يكون غير دقيق.

٤. التغييرات الكيميائية الحيوية

يرجع معظم التباين فى مزارع الأنسجة إلى التغييرات فى التركيب الكيميائى للحامض النووى، لكن ليس من الضرورى أن يترجم بتغيير فى الشكل الظاهرى، وربما يتطلب الأمر بعض الاختبارات الدقيقة للكشف عنها. والعديد من هذا النوع من التغييرات يفقد أثناء الكشف أو لا يورث بطريقة مندلية. ومن هذا النوع الخلل الشائع فى بعض النباتات النجيلية كالأرز والقمح فى أيض الكربون الذى يسبب تكشف نباتات خالية من الكلوروفيل وكذلك الخل فى أيض النشا والكاروتينات والنروجين ومقاومة المضادات الحيوية. ويعتبر اكتساب مقاومة المضادات الحيوية

أو الحساسية لها ذات أهمية كبرى فى إنتاج النباتات المحورة وراثيا (Jayasankar, 2005).

أسباب التباين الحادث فى زراعة الأنسجة

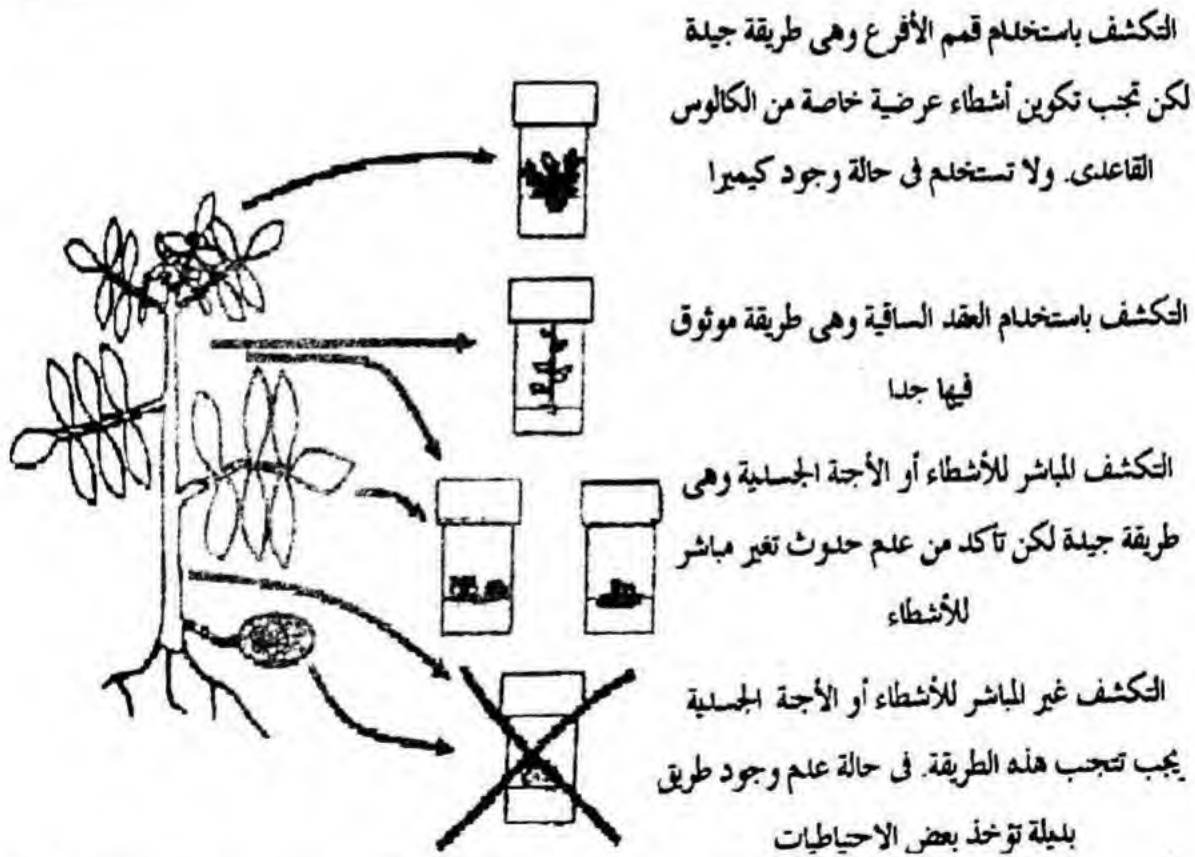
١. النوع النباتى والجزء المستعمل للإكثار

يختلف مدى حدوث التباين فى الخلايا والنباتات الناتجة باختلاف الأنواع النباتية، فبعض الطرز الوراثية مثل Lily و Hyacinth و Ornithogalum وبعض أصناف Saintpaulia تظهر ثباتاً وراثياً فى زراعة الأنسجة بدرجة كبيرة حتى أثناء التكاثر بالبزاعم العرضية؛ على العكس من بعض الأنواع مثل Begonia و Freesia للذان يظهران معدلات عالية من الطفرات. وأكثر حالات الثبات الوراثى للكاس وجدت فى كاس نخيل الزيت. وعندما تستعمل أنسجة نباتية من خلايا ليس بها تضاعف فإن الكاس أو الخلايا الناتجة غالباً ما تكون ثنائية العدد الكروموسومى. ويمكن الحفاظ على هذا المستوى من الثبات لمدة طويلة باستعمال الأنسجة الميرستيمية. ولا يقف معدل التباين على النوع النباتى فقط بل يبين (Mandal et al., 2000) فى جدول رقم (٧-١) التباين أن عدد النباتات التى تكشف ومعدل الطفرات اللونية فى أزهار الاراولا عقب المعاملة ببعض الأشعة قد تأثر بدرجة عالية باختلاف المستأصل النباتى. كما يبين الشكل رقم (٧-٧) أن طريقة التكاثر والجزء النباتى المستعمل لهما تأثير على معدل التباين الحادث فى زراعة الأنسجة (George, 1993).

جدول ٧-١: تأثير استعمال أجزاء نباتية مختلفة على الكشف واستحداث الطفرات فى نباتات الأراولا.

مصدر الجزء النباتى	عدد النباتات المتكشفة	عدد الطفرات	% لطفرة لونية ثابتة
عقد ساقية	٤٠٤	٢٦٠	٦٤
قمم الأفرع	٦٣	١٢	١٩
السلاميات	٩٠	٨	٩
الأزهار الشعاعية (البنفسجية)	٤٨	٤٨	١٠٠
الأزهار الشعاعية (البيضاء)	١٩٦	١٩٦	١٠٠

يُعتقد الكثير أن هناك درجة عالية من الثبات الوراثي لمزارع الأجنة الجسدية بالمقارنة مع تكشف الأعضاء، لكن هناك الكثير من الدراسات تشير إلى عكس ذلك. لكن يبدو أن الحساسية للتغيرات الوراثية تختلف باختلاف الأصناف والسلالات النباتية، فالكالسات الناتجة من الأنواع المفتوحة التلقيح من Lettuce كانت محتوية على صور مختلفة من التضاعف عن تلك الموجودة في الكالسات الناتجة من النباتات الأم. وبعض النباتات الثنائية مثل Asparagus و Hemerocallis لها قدرة عالية على الاحتفاظ بالعدد الثنائي والقدرة على الكشف حتى بعد فترة طويلة نسبيا من إنتاج الكالس. لكن من غير المعروف كيف يلعب التركيب الوراثي هذا الدور.



شكل ٧-٧: تأثير الجزء المستعمل للإكثار وطريقة الإكثار الدقيق على التباين الحادث في زراعة الأنسجة (George, 1993).

٢. ارتباط مجموعات الميثيل بالحامض النووي DNA-Methylation

حتى وقت قريب لم يكن معروفاً لماذا تحدث التغيرات الوراثية في زراعة الأنسجة. لكن من الثابت الآن أن معظم إن لم يكن كل التغيرات الوراثية الموروثة في زراعة الأنسجة ترجع بطريقة مباشرة أو غير مباشرة إلى تغير في عدد مجموعات الميثيل المرتبطة بالحامض النووي. وتعمل الميثلة ببساطة على عدم نسخ الجين مما يوقف تعبيره عن نفسه. وهذا التغير في ميثلة الحامض النووي ربما يرجع كما أشار Munksgaard *et al.* (1995) إلى:

١. تكوين أو تنشيط بعض الإنزيمات الخاصة بعملية الميثلة.
٢. نقص معدل تخليق أو تثبيط الإنزيمات التي تقوم بعكس عملية الميثلة أي نزع مجموعات الميثيل من الحامض النووي.
٣. تغيير تركيز المواد أو العوامل المساعدة التي تشارك في هذه التفاعلات. فالتغير في معظم الصفات الكمية بل حتى تنشيط العناصر النقالة والكسور الكروموسومية وتأخير نسخ بعض المناطق في الكروموسومات قد ترجع إلى عملية ميثلة للحامض النووي (Phillips *et al.*, 1994). فإذا كان عدد تلك المجموعات كبير يحدث تثبيط للجين، وبانخفاض عددها يزيد نشاطه. وعلى العموم هناك معدل ونظام طبيعي لارتباط مجاميع الميثيل بالحامض النووي. ويزيد ارتباط مجموعات الميثيل بالأحماض الأمينية الأدينين والسيتوسين في مزارع الأنسجة. لكن ربما لا يتضح تغيير في الطرز المظهرى بسبب ذلك وقد سجل بالفعل تغيير في ارتباط مجموعات الميثيل في مزارع أنسجة الذرة والبطاطس والعنب لكن لا يعرف سبب ذلك (Jayasankar, 2005). وبناءاً على تلك النظرية فإن زيادة أو نقص مجموعات الميثيل المرتبطة بالحامض النووي يكون سبباً في:

- حدوث الطفرات النوعية في الجينات المتحكمة في جين واحد أو أكثر.
- زيادة نشاط العناصر النقالة التي تكون في حالة ساكنة.
- تحفز التغير في الصفات الكمية.
- تنشيط الطفرات التي تحدث بسبب الكسور الكروموسومية.

إن حدوث كسر في أحد الكروموسومات أو تغير مستوى ارتباط مجموعات الميثيل في أحد المواقع ينتج عنه زيادة ارتباط مجموعات الميثيل بمناطق أخرى وكذلك تنشيط عناصر نقالة أخرى، وبالتالي فإن حدوث تغيرات وراثية يؤدي إلى حدوث المزيد من التغيرات الوراثية الجديدة وبالتالي زيادة معدل التباين. وقد أكد Joyce & Cassells (2002) باستخدام تقنية AFLP تأثير ارتباط مجموعات الميثيل بحامض السيتوزين على حدوث تغيرات ظاهرية في نباتات البطاطس المستولدة من زراعة الأنسجة. وفي معظم الحالات كان هناك ارتباط بين التغير في الطرز المظهرية والتغير في معدل ارتباط الميثيل بالسيتوزين. كما أن هناك العديد من الدلائل التي تؤكد أن زيادة نشاط العناصر النقالة وارتباط مجموعات الميثيل من الأسباب التي تؤدي إلى انخفاض معدل الكشف بقدوم عمر المزرعة. ويمكن القول أن نشاط العناصر النقالة هو السبب في التغيرات الوراثية في الكالسات والخلايا التي تحدث عند الاحتفاظ بالمزرعة لفترة طويلة.

بفرض أن التغير في مستوى ارتباط مجموعات الميثيل بالحامض النووي في الخلية التي تكشف منها النبات هو المسئول عن التغيرات الوراثية فما هو سبب هذا التغير في معدل الارتباط؟ قد يقال أن الظروف غير العادية للزراعة المعملية تؤدي إلى خلل في العمليات الفسيولوجية في الخلايا مسبباً هذا الخلل الوراثي. لكن يبدو أن هذا التصور غير مقنع، حيث لا توجد غالباً تغيرات وراثية في مزارع القمم الميرستيمية ومزارع الأعضاء المنزرعة تحت نفس الظروف البيئية التي تحدث تغيرات وراثية في بعض الأجزاء النباتية الأخرى. لكن من المعروف أن الأوكسين يؤدي إلى زيادة ارتباط مجموعات الميثيل بالحامض النووي، ويحدث ذلك بطريقة عشوائية. وتختلف هذه التغيرات باختلاف نظام الزراعة بل قد يعود بعضها إلى مواد التعقيم السطحية المستعملة لتعقيم النسيج (George, 1993).

٣. الخلل في تضاعف الحامض النووي

يتم تضاعف الحامض النووي للكروموسوم أثناء المرحلة S من دورة انقسام الخلية حيث يتم ابتعاد شريطي الحامض النووي عن بعضهما البعض ثم يتم نسخ كل منهما لعمل نسخة مكتملة له. ولا يتم نسخ كل أجزاء الكروموسوم في ذات الوقت فبعض مناطق Heterochromatin والتي يعتقد أنها خاملة وراثياً بمعنى أنها لا تحتوى على جينات فعالة لكنها تلعب دوراً في ميكانيكية عمل الكروموسوم يتم نسخها بعد المناطق الأخرى من الحامض النووي وهي التي تحدث فيها الكسور الكروموسومية. وفي زراعة الأنسجة يعتقد أن تضاعف الحامض النووي يتم متأخراً في المرحلة S من دورة الخلية. لذا فإن مناطق Heterochromatin قد لا يحدث لها تضاعف بصورة كاملة قبل انقسام الخلية. وربما يعود ذلك إلى السرعة غير العادية في معدل انقسام الخلايا. وبذلك يحدث الكثير من التغيرات الكروموسومية مثل التضاعف والكسور والتغيرات الوصفية. وفي الثدييات وجد أن زيادة ارتباط مجموعات الميثيل يكون مرتبط بالتأخر في نسخ الحامض النووي وقد تكون هذه الحقيقة صحيحة أيضاً في الأنسجة النباتية (George, 1993) و (Gaha & George, 2008).

٤. نقص بادئات الأحماض النووية

تتطلب عملية الانقسام السريع للخلايا في معظم أنواع مزارع الأنسجة تخليق كمية كبيرة من المواد اللازمة لتخليق الأحماض النووية مثل القواعد النيتروجينية، وكذلك العديد من الإنزيمات والبروتينات الضرورية لتضاعف المادة الوراثية. ويؤدي عدم توافر هذه المواد إلى حدوث معدل عالي من الطفرات. وفي بعض التجارب أدت إضافة بعض الأحماض الأمينية كالتربتوفان إلى تقليل معدل الطفرات وثبات الانقسام الخلوي (George, 1993).

٥. منظمات النمو

مما لا شك فيه وجود تأثير الظروف البيئية المختلفة خاصة تلك التي تمثل عوامل إجهاد على نشاط الجهاز الوراثي في الخلية. ولما كانت ظروف مزارع الأنسجة نفسها من منظمات نمو وعناصر مغذية بل وحتى المواد المستعملة في التعقيم السطحي تمثل صور مختلفة من عوامل الإجهاد فإنها تقود إلى العديد من التباينات في النباتات المستولدة. وهناك العشرات من الدلائل على ذلك كحدوث تضاعف في نباتات *Crepis capillaris* الناتجة من زراعة الأنسجة على الرغم من حقيقة الثبات الوراثي لها، كذلك التباين الحادث في النباتات الناتجة من خلية فردية أو في مزارع البروتوبلاست (Bhojwani & Razdan, 1996). يعتبر نمو الكالسات ومعلق الخلايا صورة غير عادية من النمو ولكي يتحقق هذا الغرض لابد من إضافة تركيزات عالية من منظمات النمو خاصة الأوكسينات. ومن المؤكد أن التركيب الوراثي لعشيرة من الخلايا في الكالس أو المعلق الخلوي يتأثر بتركيز كلا من الأوكسينات والسيبتوكينينات المضافين إلى وسط النمو. وغالباً تكون نسبة الخلايا العادية الثابتة وراثياً أعلى في البيئة المحتوية على تركيزات أقل من منظمات النمو أو في حالة عدم وجودها كلياً. ويتناسب معدل حدوث الطفرات مع وجود كلا النوعين من منظمات النمو.

ولقد أصبح معروفاً أن الأوكسينات من العوامل التي تزيد بشدة معدل حدوث التغيرات الوراثية، لكن تظل آلية هذا التغيير غير معلومة على وجه الدقة، ويعتقد أنها ترجع إلى زيادة معدل انقسام الخلايا التي بها تغيرات وراثية أصلاً أو زيادة ارتباط مجموعات الميثيل بالحامض النووي. وعادة يصاحب التركيزات العالية من منظمات النمو تغيير في الطرز المظهرى كزيادة التفريع أو استطالة وربما تقزم النباتات لكن لا يورث هذا التباين في معظم الحالات. وتختلف الأنواع المختلفة من الأوكسينات في مدى إحداثها تغيرات وراثية في زراعة الأنسجة، ويتوقف ذلك أيضاً على النوع النباتي. ويعتبر 2,4-D من أكثر الأوكسينات إحداثاً للتغيرات الوراثية كذلك يعمل الكينيتين على

تحدث انقسام الخلايا المتضاعفة، فعلى سبيل المثال وجد أن معدل التغيرات الوراثية في زراعة الأنسجة لنباتات حبة البركة يتلازم مع زيادة تركيز 2,4-D مع ثبات تركيز الكينيتين.

وأثبت LoSchiavo *et al.* (1989) أن معظم حالات المبثلة في خلايا مزارع الجزر ترتبط مباشرة بالتركيز الهرموني حيث قل معدلها عند استعمال الكينيتين زادت استعمال 2,4-D. وفي الواقع هناك جدل حول تأثير 2,4-D، يعتبره البعض سبباً في حدوث التضاعف بينما يشير البعض إلى أنه فقط يستحث الخلايا المتضاعفة على الانقسام لاسيما في وجود بعض المركبات الأخرى. وفي استعراض موسع لهذا الموضوع يشير Bhojwani & Razdan (1996) إلى أن استعمال 2,4-D بتركيز مرتفع يصل إلى ٢٠ ملجم/لتر يزيد من انقسام الخلايا الثنائية أما التركيز المنخفض جداً (٠.٢٥ ملجم/لتر) فإنه يزيد من معدل الخلايا المتضاعفة في مزارع خلايا البازلاء. وعموماً تزيد السيتركينينات من معدل انقسام الخلايا في زراعة الأنسجة، وعند إضافتها بتركيز منخفضة يقل معدل التضاعف في المعلق الخلوي. كما تلعب نسبة الأوكسينات إلى السيتركينينات دوراً فعالاً في التباين الوراثي. وقد زاد معدل التباين بشدة في نباتات نخيل الزيت الناتجة من مزارع المعلق الخلوي بسبب استعمال الأوكسينات، أما كالمات العنب فقد فقدت قدرتها على الكشف بطول مدة زراعتها في بيئة محتوية على الأوكسينات (Jayasankar, 2005).

٦. المكونات الأخرى لبيئة النمو

تعد مكونات البيئة أحد العوامل التي تؤثر على مستوى التضاعف الكروموسومي ونسبة الخلايا المحتوية على اختلافات وراثية. وكلما زاد محتوى البيئة من العناصر المختلفة زاد احتمال حدوث خلل وراثي خاصة حالات التضاعف الكروموسومي أثناء الانقسام. فقد لوحظ في مزارع خلايا الجزر زيادة عدد الخلايا

المحتوية على أعداد غير عادية من الكروموسومات بزيادة تركيز الفوسفات في بيئة MS. وزادت نسبة الخلايا الثنائية عندما نقل الكالس إلى نفس البيئة لكن مع خفض تركيز النتروجين إلى الربع. وفي تجربة أخرى زاد معدل الخلايا الأحادية في المعلق الخلوي لنباتات *Datura* بوجود النتروجين في صورة أمونيا ونوات على العكس من وجوده في صورة عضوية. وقد استردت معظم الخلايا حالتها العادية من التضاعف ٣٠% ثنائي من العدد الكلي عندما نقلت إلى بيئة محتوية على النتروجين في صورة عضوية فقط (Furner et al., 1978). والغريب انخفاض قدرة خلايا الجزر على تكوين الأجنة الجسدية في بيئة White بالمقارنة مع وسط MS. وفي مزارع متوك القمح وجد أن عدد الأفراد الألبينو يتأثر بمستوى نترات البوتاسيوم أضافاً، وربما يرجع ذلك إلى حدوث فقد في الحامض النووي الموجود بالسييتوبلازم. كذلك تؤدي المواد المخيلية مثل EDTA وبعض العناصر الثقيلة إلى زيادة الكسور الكروموسومية. وذلك بسبب الشحنات السالبة الموجودة على أيونات هذه المعادن ومقدرة أيوناتها على تكوين معقد ثابت مع بعض المكونات الأخرى بالخلية ويعتقد أن الزنك هو أكثر هذه الأيونات تأثيراً والكالسيوم أقلها طبقاً لترتيب (George, 1993) التالي $Zn > Cu > Ni > Co > Fe > Mn > Ca$. ويضيف (Semal Lepoivre, 1990) أن استعمال كلوريد الكالسيوم زاد من معدل التغيرات الكروموسومية في صنف البطاطس 'Bintje'.

٧. ظروف المزرعة

يعمل تقصير الفترة الزمنية التي يتم بعدها نقل المزرعة إلى بيئة جديدة كان تكون أسبوعين بدلاً من ثلاثة على الحد من التغيرات الوراثية. كذلك تؤثر طبيعة البيئة على مدى حدوث التباين، ففي مزرعة أنسجة لنبات *Hevea* لوحظ زيادة معدل التضاعف عند استعمال بيئة سائلة بالمقارنة مع البيئة شبه الصلبة. وأمكن الحصول على خلايا ثابتة من الناحية الوراثية في المعلق الخلوي لنبات *Hemerocallis spp* باستمرار إجراء تصفية للمعلق الخلوي لعزل كتل الخلايا التي تتميز بالنشاط الانقسامى وإعادة زراعتها

وانتجت هذه الخلايا عند تكشفها نباتات ثنائية ومطابقة للنبات الأم. بينما تسبب ترك المعلق دون إجراء تصفية وانتخاب الخلايا الميرستيمية في زيادة معدل التباين الوراثي في النباتات المستولدة (George, 1993).

يزيد وجود تركيزات عالية من الأكسجين في وسط النمو أو عدم قدرة الخلايا على حفظ نفسها من اثر الأكسدة من حدوث تغيرات وراثية بالخلية. وتلاحظ هذه الظاهرة بوضوح أثناء عزل وزراعة البروتوبلاست. وعلى العموم لا يتوقف تأثير عوامل الأكسدة على عزل وزراعة البروتوبلاست فقط، فقد ثبت أن الجروح التي لا بد وأن تحدث أثناء إعداد الجزء النباتي تؤدي إلى تكوين بعض الشوارد الحرة في الخلية مثل superoxide و hydrogen peroxide hydroxyl و peroxy و alkoxyl radicals التي لها فعل مؤكسد عالي قد يؤدي إلى حدوث تغيرات وراثية في الخلية إن لم يسبب أحياناً موت الخلية. وقد تضاف بعض مضادات الأكسدة للحد من ذلك. كذلك فإن بعض المواد المستعملة في التعقيم السطحي للجزء النباتي كمركبات الهيبوكلوريت يحفز حدوث الأكسدة. ومن ثم تعمل مضادات الأكسدة كبعض الأحماض العضوية التي تضاف إلى بيئة النمو على الحد من تأثير الشوارد الحرة. كما أن بعض مواد التعقيم السطحية المستعملة تعمل على تكوين بعض الشوارد الحرة free radicals التي تزيد من احتمال حدوث تغيرات وراثية. كما تؤثر درجة الحرارة التي تحفظ عليها المزرعة على درجة الثبات الوراثي لها، حيث وجد (Binns & Meins, 1980) أن حفظ بعض المزارع على درجة حرارة ٣٥ م° يزيد من التضاعف الكروموسومي الثلاثي بالمقارنة مع تلك المحفوظة على ٢٥ م°. كذلك زاد عدد النباتات البيئو في النباتات *Lilium longiflorum* المستولدة من الأجنة الجسدية للنباتات عند حفظ المزرعة على درجة حرارة ١٠-١٥ م° (Jackson & Dale, 1988).

يتناسب معدل حدوث التغيرات الوراثية الجسدية وبصورة خاصة التضاعف الداخلى بدون انقسام النواة والخلية طردياً مع عمر المزرعة. فزيادة عمر المزرعة قد يسبب زيادة فى معدل الطفرات أو تراكمها، وتقف منظمات النمو ونوع النتروجين وتركيزه والضغط الاسموزى وراء ذلك. ومن ثم يفضل أن يتم تأسيس المزرعة من مستأصل نباتى جديد كل فترة عن استمرار تجديدها من الأنسجة المتحصل عليها فى المعمل. وفى معظم الحالات يلاحظ عدم حدوث تباين فى النباتات المستولدة عقب تأسيس المزرعة فى معظم الحالات التى سجل فيها تباين شديد بين النسل المستولد بعد تجديد المزرعة لعدة مرات فى المعمل، قد وجد أن النباتات المستولدة من كالس الدخان الذى تم الاحتفاظ به معملياً لمدة طويلة كانت عقيمة ولم تنتج بذوراً أما النباتات التى تكشفت من كالسات عمرها قصير كان معدل التباين الوراثى بها أقل. لكن على العكس من هذه القاعدة يلاحظ وجود معدل عالى من التغيرات فى النباتات الناتجة من مزارع البروتوبلاست رغم قصر عمرها. ويمكن إرجاع ذلك إلى تعرض البروتوبلاست لعوامل الأكسدة أثناء العزل والزراعة. قام (Rodrigues et al. 1998) بتأسيس مزرعة أنسجة أحد أصناف الموز باستخدام القمم النامية. وقام بتجديد المزرعة عديد من المرات، وحصل من هذه المزارع على عدد ٣٨٧٤ نبات. ولم يسجل أى تباين فى النباتات الناتجة حتى التجديد الثالث، ولاحظ بدء ظهور التباينات بعد التجديد الخامس بمعدل ١.٣، و١.٣، و٣.٨، و٢.٩% بعد التجديد الخامس، السابع، التاسع والحادى عشر على التوالى. ويشير (Jambhale et al. 2001) إلى الارتباط بين معدل التباين بعد تجديد مزارع الموز ١٨ مرة وقدرتها على التضاعف.

استخدام التباينات الجسدية فى الانتخاب المعملی

بعد الاستعراض السابق للتغيرات الوراثية المعملية يتضح أن زراعة الخلايا والأنسجة النباتية قد أتاحت فرصة كبيرة فى عمليات الانتخاب على مستوى الخلايا

والأنسجة وخاصة في حالات الانتخاب لمقاومة الإجهاد البيئي أو الإحيائي. وبالفعل تم انتخاب العديد من السلالات الطفرية mutant cell lines عن طريق تعريض الخلايا لمستويات عالية تصل إلى درجة السمية من بعض المركبات مثل كلوريد الصوديوم أو أحد مبيدات الحشائش أو مشابهات الأحماض الأمينية، فتموت الخلايا التي ليس لها القدرة على تحمل هذا التركيز وتظل الخلايا التي لها القدرة على تحمله بسبب قد يكون وراثياً أو طيفياً. فإذا تمكنت هذه الخلايا من الكشف إلى نبات قريباً يحمل نفس صفة التحمل لهذا المركب ويورثها إلى نسله، هذا بالطبع لو كان التغيير الحادث في الخلية المنتخبة وراثياً، واستخدمت هذه الطريقة في التحسين الوراثي لكثير من النباتات. لكن يعيب هذه الطريقة عدم إمكانية استخدامها لتحسين الصفات المحصولية. كما أن هناك بعض المعوقات الأخرى في سبيل استخدام هذه التقنية حيث أن عديد من الخلايا المنتخبة تكون متباينة وراثياً بدرجة كبيرة وبالتالي فإن النباتات المستولدة منها غير مطابقة للنبات الأم. والمشكلة الأخرى أن الاستجابة التي تظهر على المستوى الخلوي قد تختفي على مستوى النبات الكامل في الحقل لاختلاف ميكانيكية الاستجابة (Duncan, 1997) و (Veilleux & Johnson 1998).

معظم التغييرات الحادثة في مزارع الأنسجة تكون راجعة لحدوث طفرات في التركيب الوراثي ويكون معدل حدوث تلك الطفرات في المعلق الخلوي عالى جداً حيث يصل إلى ٠.٠٣-٠.٠٧ طفرة/خلية في الانقسام الواحد بدون إضافة أى مادة مطفرة (George 1993). ويقل هذا المعدل بوضوح في حالة زراعة الأعضاء الكاملة. وتزيد هذه النسبة بإضافة مواد مطفرة للبيئة أو معاملة الجزء النباتي بها قبل الزراعة. وتجدر الإشارة إلى أن المظهر الأولي الدال على وجود الطفرة في الكالس هو وجود أجزاء متباينة في اللون أو الشكل أو القوام. وبناءً على ذلك فإنه من المتوقع أن تكون النباتات المستولدة من أجزاء مختلفة ظاهرياً من الكالس مختلفة عن الأمهات ومتباينة فيما بينها أيضاً.

وتجدر الإشارة أن التباين في الكالس يكون أعلى من التباين في النباتات حيث تميل الخلايا التي لا تحوى تباين إلى الكشف بمعدل أعلى من تلك التي تحوى على معدل عالى من الاختلافات لكن بالطبع لا تتضح كل الطفرات في مرحلة الكالس وربما لا تتضح حتى في طور البادرة أو مرحلة النمو الخضري، كان تكون الطفرة مرتبطة بوجود ظروف بيئية معينة أو أن التعبير عنها يتم في مرحلة الإزهار أو عقد وتكوين الثمار، وربما يكون التغير متعلق بصفات البذور الناتجة. وبدون شك فإنه يمكن بإتباع طرق وراثية متقدمة الكشف عن هذه التغيرات في مرحلة مبكرة جداً وبمجرد حدوثها في الخلية. ولعل سبب فقد معظم الخلايا القدرة على الكشف في مزارع الأنسجة يتقدم عمر المزرعة هو تراكم العديد من الطفرات التي تحول دون حدوث الكشف ولا ينصح باستعمال مزارع أجنة جسمية عمرها أكثر من ٦ شهور للكشف (Von Arnold, 2008).

وهذه التغيرات تشمل كلا من الصفات الوصفية والصفات الكمية، ولا يقتصر حدوثها على المادة الوراثية الموجودة في النواة فقط بل يحدث ذلك أيضاً في المادة الوراثية الموجودة في العضيات السيتوبلازمية، لكن من الثابت عملياً أن معظم الطفرات تحدث في المادة الوراثية الموجودة بالنواة. وتكون نسبة الطفرات في الصفات الوصفية منخفضة بالمقارنة بالصفات الكمية المتأثرة بالعوامل البيئية. وعلى العموم قد تتشابه هذه التغيرات مع التغيرات التي تحدث في الطبيعة باستخدام بعض الكيماويات أو الأشعة المؤينة، لكنها تحدث بطريقة مختلفة وفريدة. فالطفرات الحادثة في الطماطم باستخدام زراعة الأنسجة كانت مختلفة تماماً عن تلك المستحدثة بالمواد المطفرة (Gavazzi et al., 1987). وكما سبق القول فالعديد من الطفرات الحادثة في زراعة الأنسجة سلبية التأثير، ومن ثم فإن الاعتماد على زراعة الأنسجة كمصدر للتباين الوراثي وإن كان قد ساهم فعلاً في العديد من برامج التحسين النباتي- لن يحقق الهدف الذي عول عليه في البداية.

الاستفادة من النباتات المتباينة وراثيا

كما سبق القول قد تحتوى السلالات النباتية التى تتكشف من الكالس والتى يطلق عليها السلالات الكالسية calli clones على تغيرات وراثية فيما بينها وكذلك بينها وبين النبات الأم. وتم وصف التباين الموجود بين كثير من النباتات المتكشفة معمليا لعدد من الأنواع النباتية فى عدد من الأبحاث. لكن فى معظم الأبحاث اكتفى بوصف تلك الاختلافات دون توضيح ما إذا كانت هذه التغيرات مقتصرة على الشكل الظاهرى للنمو الخضرى والأزهار من الناحية الكمية أو الوصفية كذلك المحصول أم هى انعكاس للتغير فى التركيب الوراثى بالتالى يمكن الاستفادة منها بصور عدة. ورغم أن الكالس قد يحتوى على خلايا متباينة وراثيا إلا أنه ليس من الضرورى أن يتكشف منها نباتات.

ويمكن التحكم فى بعض العوامل التى تحفز زيادة التباين الوراثى فى الخلايا وبالتالى ينعكس ذلك على النباتات المتكشفة. وأمكن باستخدام زراعة الأنسجة الحصول على أصناف جديدة من أنواع نباتية عدة منها على سبيل المثال *Pelargonium* و *Petunia* وقصب السكر والدخان. وتميزت هذه الأصناف المستولدة عن الصنف المستعمل كأمهات للإكثار إما من ناحية الشكل الظاهرى كبعض أصناف *Hemerocallis* المتقزمة التى أنتجت من الكالس، أو تكون الفروق فى بعض الصفات الوظيفية كالمقاومة للإجهاد البيئى مثل الملوحة أو الجفاف وكذلك المقاومة لبعض الأمراض. ويوضح جدول رقم (٧-٢) بعض الأصناف التى تم إنتاجها باستخدام *somaclonal variation*. وفى البرسيم الحجازى كانت النباتات الناتجة من كالس واحد غير متباينة من حيث الشكل الظاهرى لكن التلقيح الذاتى لهذه النباتات أنتج أفراد بينها تباين شديد ويدل ذلك على أن التغيرات الحادثة كانت متنحية (George, 1993).

تكون درجة التباين بين النباتات الناتجة من التكشف المباشر أقل من النباتات الناتجة من التكشف غير المباشر. ولهذا تستخدم طريقة التكشف المباشر للأفرع لإكثار

عدد كبير من نباتات الزينة خاصة تلك التابعة للعائلة Gesneriaceae حيث تستخدم أعناق الأوراق كمصدر للجزء المنزرع (George, 2008) . وفى بعض الحالات يتم تكشف الأفرع من خلايا طبقة البشرة Epiderme وفى البعض الآخر يتم اشتراك أكثر من طبقة من الخلايا فى تحسيف الأفرع (Singh *et al.*, 2009) ومن ثم يكون هناك احتمال أكبر للحصول على كيميرا من النوع المحيطلى Periclinal.

لكن أمكن إنتاج نباتات بينها تباين عند استخدام أجزاء نباتية محددة من *Begonia* فى مزارع الأشطاء. وكانت نسبة التباين أعلى عند استعمال النباتات ذات الأزهار المجوز من الصنف Rieger ذات الأزهار المفرد، على الرغم من أن الأشطاء تتكشف من طبقة خلايا البشرة وزادت نسبة التباين فى النباتات المستولدة عند فصل هذه الطبقة واستعمالها بمفردها كجزء منزرع دون الطبقات السفلى. ويكون بمزارع الجذور نسبة عالية من التباين الوراثى وغالبا تكون النباتات المتكشفة منها متباينة (George, 1993).

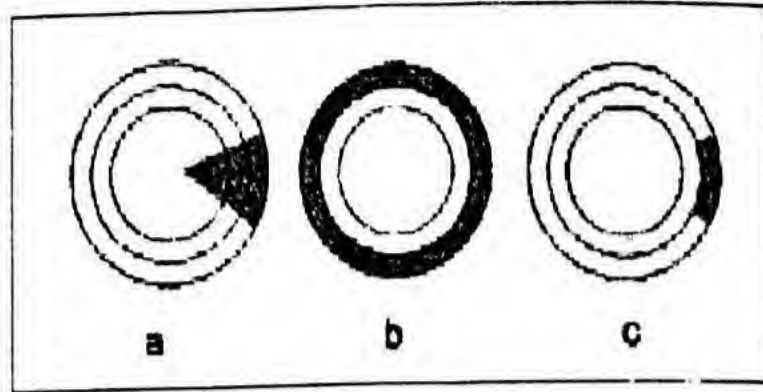
جدول ٧-٢: بعض الأمثلة للأصناف التي تم استنباطها باستخدام somaclonal variation (Jain, 2001 & Chawla, 2000)

النبات	الصفة الجديدة	الصنف المستنبط
<i>Hemerocallis</i>	Dwarf, short flowers, male sterile	Yellow Tinkerbelle
<i>Pelargonium</i>	Aromatic content	Velvet Rose
<i>Torenia</i>	white flowers, compact plant	U Conn White
<i>fournieri</i>		
<i>Oryza sativa</i>	Picularia resistance, improved cooking quality	DAMA
	Rhizoctonia resistance, germplasm release	LSBR-5, LSBR-33
<i>Musa</i>	Fusarium wilt resistance	commercial cultivar
Wheat	High yield	'He Zu No.8
<i>Lathyrus sativus</i>	reduced neurotoxin in feed grain, high yield, early maturing	P-24
Potato	non-browning	White Baron
<i>Zea mays</i>	variant for grain & forage use	Yidan No.6
Blackberry	thornless	Lincoln Logan
Flax	salt & heat tolerance	ANDRO
Celery	<i>Fusarium</i> R	UC-TC
	<i>Fusarium</i> yellows resistance (<i>F. oxysporum</i>)	MSU-SHK5
	<i>Fusarium</i> yellow R, insect resistance (<i>Spodoptera exigua</i>),	K-26, K-108, & K-128
Tomato	<i>Fusarium</i> R	DNAP-17
	Tomato high solid contents	DNAP9
<i>Cymbopogon</i>	aromatic grass, 50–60% increased oil yield	CIMAP/Bio-13
<i>Capsicum</i>	yellow fruit,	Bell sweet
	early maturing & high yielding	cv A-D4
<i>Brassica juncea</i>	high yield, shattering resistant	Pusa Jai Kisan
<i>Cyanodon</i>	fall armyworm (<i>Spodoptera</i>)	P1572566
<i>dactylon</i>	resistance	Brazos-R3

الكيميرا ودورها في التباين المظهري النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة

يطلق على الفرع أو النبات أن به كيميرا Chimara إذا اشترك حدد من الخلايا ذات الطرز الوراثية المختلفة معاً في تكشفه بحيث يكون هناك عدة طبقات منفصلة ومتميزة عن بعضها البعض. وأثناء تكوين الكالس قد يلاحظ وجود أنسجة مختلفة عن بعضها البعض. وذلك إما لوجود اختلافات في النسيج الأصلي المستعمل في الزراعة أو لحدوث هذه التغييرات أثناء الزراعة كما سبق أيضاً. وتحدث الطفرات في الطبيعة بمعدل منخفض ولكن إذا لم تشترك الخلية التي بها طفرة في تكوين أنسجة ميرستيمية وبالتالي تكوين أنسجة خضريه أو بذور أو حبوب لقاح فإن الطفرة لا ينتج عنها تكوين نسيج كيميرا واضح.

لكن لو حدثت الطفرة في الخلايا الميرستيمية فإن طبقة واحدة أو أكثر من أنسجة النبات تكون مختلفة عن المجاورة. وهناك عدة طرق متباينة لتوزيع هذه الأنسجة فقد تكون في طبقة طولية أو عرضية أو خارجية كما في شكل رقم (٧-٧). ويرجع ذلك لكون الخلايا سريعة الانقسام الموجودة في القمم النامية موجودة في ثلاث طبقات منفصلة عن بعضها البعض؛ الطبقة L1 و L2 تكونان ما يسمى بالغطاء Lunica أما الطبقة الثالثة L3 فتكون ما يسمى بالبدن Corpus. وباقي الأنسجة النباتية بعد ذلك تكون امتداداً لإحدى هذه الطبقات. فالأشواك على سبيل المثال تتكون من الطبقة الخارجية فقط أما الجذور العرضية فإنها تتكون من الطبقة الثالثة الداخلية أما الأفرع العرضية فتتكون من الطبقة الخارجية فقط أو من الطبقتين الخارجيتين وربما من اتحاد الطبقات الثلاثة. وأول من وصف تكوين أفرع بها كيميرا في زراعة الأنسجة هو Carlson & Chaleff في سنة ١٩٧٤ حيث استطاعا الحصول على ٢٨ فرعاً بهم كيميرا من أصل ٧٠٠٠ نبات متكشفاً من البراعم العرضية لنبات *Nicotiana tabacum* و *N. glauca x N. langsdorffii*



شكل ٧-٧: قطاع عرضي في القمة الميرستيمية لفرع يوضح الطبقات الثلاثة المكونة له L1, L2 و L3 ويتضح وجود الثلاث أنواع من الكيميرا (A) كيميرا قطاعية و (B) كيميرا محيطية و (C) كيميرا محيطية جزئية. (Burge et al., 2002)

يحدث إعادة ترتيب في الطبقات المختلفة المكونة لنسيج به كيميرا أثناء تكوين الكالس في الإكثار المعملّي، وبالتالي إذا تكشفت الأشطاء بطريقة غير مباشرة تتكشف نباتات بها صور متباينة من الكيميرا ومختلفة عن النبات الأم كما في الشكل رقم (٧-٨). وبمجرد تكوين الكيميرا فإن الشكل الظاهري الجديد قد يكون ثابتاً وبالتالي ينتقل بالإكثار الخضري، ففي إحدى التجارب لإكثار نباتات *Chrysanthemum morifolium* كان ١٥% من النباتات الناتجة من الكالس متباينة ظاهرياً بالمقارنة مع النبات الأم حيث كانت أكثر تفريعاً والأزهار أصغر حجماً وشكلها غير عادي، ومتأخرة في الإزهار لكن لم يكن من الواضح ما إذا كان السبب هو حدوث كيميرا أو تغيرات وراثية. ويمكن توضيح صعوبة استعمال الكيميرا الناتجة في مزارع الأنسجة في برامج تربية النبات فيما يلي:

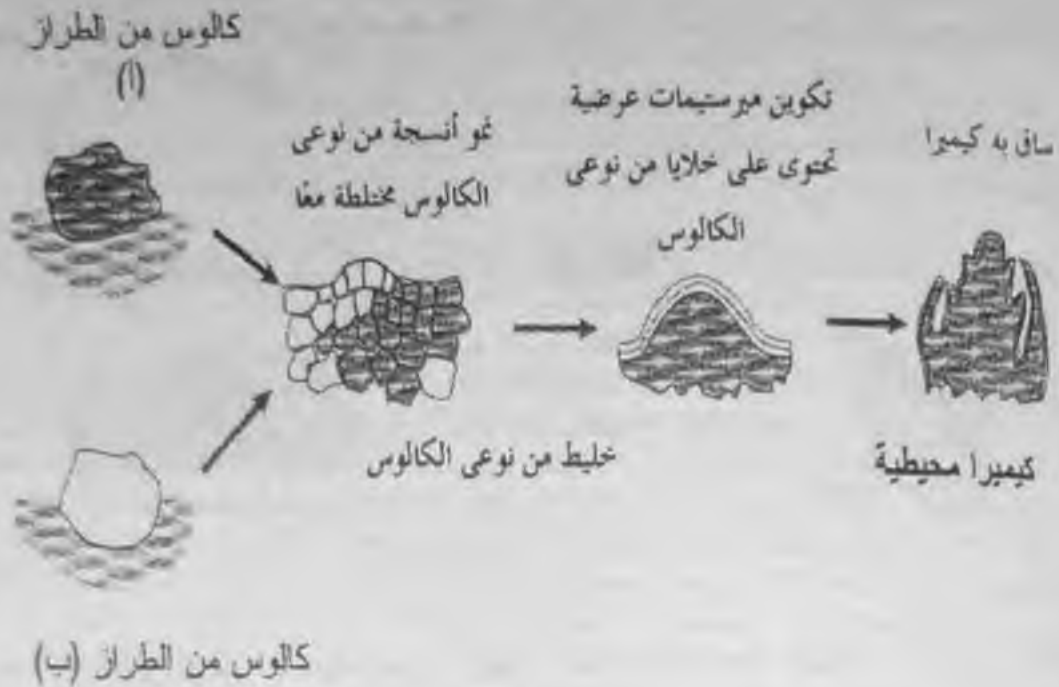
١. صعوبة التحكم في تحديد المناطق الميرستيمية التي تتكشف منها الأشطاء بالإضافة إلى أن بعض الأشطاء تتكون من براعم عرضية حتى في حالة استخدام مزارع الأفرع.

٢. قد تشجع الزراعة المعملية انقسام نوع محدد من الخلايا دون الأخرى وبذلك يتم استبعاد أحد أنواع الخلايا في التكشف.

٣. تؤدي سرعة انقسام الخلايا إلى إعادة ترتيب أو انقسام طبقة من الخلايا دون الأخرى مكونة صورة جديدة من الكيميرا.

ومن ثم اعترض موراشيچ على استعمال الأنسجة المحتوية على الكيميرا في الإكثار المعملی وعلى الرغم من ذلك نجح إكثار بعض أصناف *Chrysanthemum* و *Carnation* المحتوية على كيميرا. إن لم تتبع طريقة تضمن بقاء الانقسام الخلوي للمحافظة على الكيميرا، ويتم ذلك بخفض تركيز السيٲوكينين في البيئة. لكن يبدو أن الكيميرا في حد ذاتها تؤثر على مدى حدوث التكثف، حيث وبتعريض عقل طرفية من نباتات الأراولا *Chrysanthemum morifolium* cv. Maghi لأشعة جاما بمقدار ١.٥-٢.٥ كيلوراد طول موسم أنمو تم الحصول على العديد من صور الكيميرا في لون الأزهار وتبرقش الأوراق (شكل رقم ٧-٨). وكمحاوله لعزل هذا التباين في صورة طفرات ثابتة قام (Mandal et al., 2000) باستخدام تكنيك زراعة أنسجة أجزاء نباتية مختلفة من هذه النباتات معمليا. وبالفعل أمكن عزل طفرتين لتبرقش الأوراق وكذلك طفرات ذات ألوان جديدة استعملت كبداية لتكوين صنف جديد. ويبين شكل رقم (٧-٩) تأثير استعمال أجزاء نباتية مختلفة على عزل طفرات لونية من نبات الأراولا، وقد استخدمت نفس الطريقة للحصول على سلالات جديدة من قصب السكر. وفي حالات وإن كانت قليلة تتكون الكيميرا عند اشتراك نوعين مختلفين من الكالس في تكوين الفرع كما في الشكل رقم (٧-١٠).

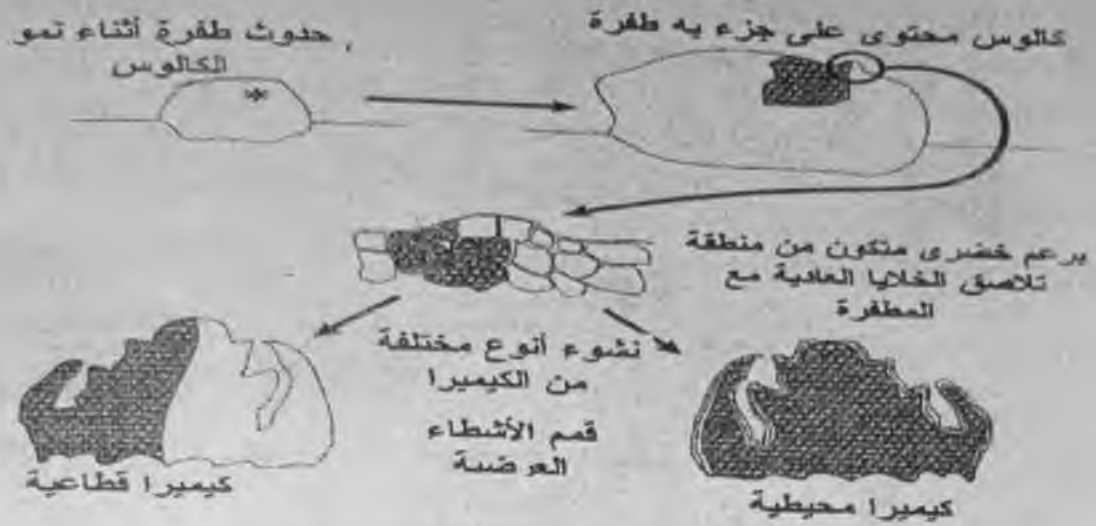
وتلعب العوامل البيئية أثناء الإكثار دوراً بارزاً في ظهور الكيميرا أو اختفائها من النباتات المستولدة، فعند زراعة أنسجة نبات *Hosta decorata* لمدة طويلة داخل المعمل تكونت أفرع من براعم عرضية وبراعم جانبية، لكن فقدت النباتات الناتجة صفة التخطيط الموجودة بالأوراق، وأمكن استعادة تلك الصفة جزئياً بوضع النباتات الناتجة في حجرة باردة حيث تكونت حافة بيضاء خلال ٤ أسابيع في ٣٠% من النباتات وزادت هذه النسبة إلى ٥٠% بعد ١٢ أسبوع. ويرجع ذلك لدخول النباتات مرحلة البلوغ تدريجياً. أما اختفاء لون أوراق *Episcia* المتكشفة في مزارع الأنسجة فيرجع إلى دخول النباتات مرحلة الصبا مرة أخرى (George, 1993).



شكل ٧-٨: تكوين كيميرا جديدة في الأفرع المتكشفة من خلط نوعين مختلفين من الكالكس وربما من نوعين نباتيين مختلفين (George, 1993).



شكل ٧-٩: كيميرا لوتية للنورة الزهرية في نباتات الأراولا عقب المعاملة بأشعة جاما في البنين وفي اليسار كيميرا لتبرقش الأوراق (Mandal et al., 2000).



شكل ٧-١٠: تكوين كيميرا بسبب وجود طفرة في الكالس المستعمل للإكثار (George, 1993).

قائمة المراجع

- Abdolmaleki P., Ghanati F., Sahebamei H. & Sarvestani A.S. (2007) Peroxidase activity, lignification & promotion of cell death in tobacco cells exposed to static magnetic field. *The Environmentalist*, 27: 435-440.
- Abreu-Tarazi M.F., Navarrete A.A., Andreote F.D., Almeida C.V., Tsai S.M. & Almeida M. (2009) Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated "axenic" pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 555-560.
- Adkins S.W., Shiraishi T. & McComb J.A. (1990) Rice callus physiology-identification of volatile emissions and their effects on culture growth. *Physiologia Plantarum*, 78: 526-531.
- Afaque Q., Koche V., Sharma P. & Mishra S.K. (2004) *In vitro* clonal propagation of neem (*Azadirachta indica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78: 281-284.
- Afreen-Zobayed F., Zobayed S.M.A., Kubota C., Kozai T. & Hasegawa O. (2000) A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. *Plant Science*, 157: 225-231.
- Ahloewalia P.S. & Prakash J. (2004) Physical components of tissue culture technology. In: Low Cost Options for Tissue Culture Technology in Developing Countries. Proceedings of a technical meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Held in Vienna, 26-30 August, 2002.
- Ahmed K.Z., Aly M.K.A., Shadia K.A. & Kamel H.M. (2010) *In vitro* isolation, culture and plant regeneration from mature embryos of Egyptian Cummin (*Cuminum cyminum* L.). Minia 2nd Conf. Agric. & Environ. Sci., Minia, Egypt, March 22-25, 2010, pp. 447-456.
- Ahmed M.B., Akhter M.S., Hossain M., Islam R., Choudhury T.A., Hannan M.M., Razvy M.A. & Ahmad I. (2007) An Efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with an aphidicidal gene, *Pta* (*Pinellia ternata* Agglutinin). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2: 155-160.
- Ahn I.O., Bui Le C., Tran K. (1996) Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture in *Panax ginseng*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45: 237-243.
- Al-Al-Mallah M., Davey M.R. & Cocking E.C. (1989) Formation of nodular structures on rice seedlings by *Rhizobia*. *Journal of Experimental Botany*, 40: 473-478.
- Ali A., Naz S., Siddiqu F.A. & Iqbal J. (2008) An efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. *Pakistan Journal of Botany*, 40: 139-149.
- Al-Juboory K.H., Skirvin R.M. & Williams D.J. (1998) Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia *Gardenia jasminoides* Ellis leaf explants. *Scientia Horticulturae*, 72: 171-178.

- Al-Khayri J.M. & Al-Bahrany A.M. (2001) Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryo genesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 89: 291-298.
- Al-Khubary A.Y. (2008) Propagation of fig trees (cv. Brown turkey) by tissue culture technique. MSc. Thesis, King Saud University, Saudi Arabia.
- Al-Qahtani A.M.R. & Alkhateeb A.A. (2008) Alternative to agar: effect of different growing media on *in vitro* production of somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khalass. *Acta Horticulturae*, 779: 649-654.
- Amoo S. O., Finnie J. F. & Van Staden J. (2009) Effects of temperature, photoperiod and culture vessel size on adventitious shoot production of *in vitro* propagated *Huernia hystrix*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99: 233-238.
- Antoine A.F., Faure J., Cordeiro S., Dumas C., Rougier M. & Feijo J.A. (2000) A calcium influx is triggered and propagates in the zygote as a wavefront during *in vitro* fertilization of flowering plants. *The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97: 10643-10648.
- Arnholdt-Schmitt B. (1993) Rapid changes in amplification and methylation pattern of genomic DNA in cultured carrot root explants (*Daucus carota* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 793-800.
- Arnison P.G., Donaldson P., Ho L.C.C. & Keller W.A. (1990) The influence of various physical parameters on anther culture of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20: 147-155.
- Arnozis P.A., Nelemans J.A. & Findenegg G.R. (1988) Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in plants grown with either NO_3^- or NH_4^+ as inorganic nitrogen source. *Journal of Plant Physiology*, 132: 23-27.
- Arora R. (2003) Induction and release of bud dormancy in woody perennials, a science comes of age. *Hortscience*, 38: 911-921.
- Arrebola M.L., Socorro O. & Verpoorte R. (1997) Micropropagation of *Isoplexis canariensis* (L.) G. Don. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49: 117-119.
- Asao H., Arai S., Sato T. & Hirai M. (1994) Characteristics of a somatic hybrid between *Solanum melongena* L. and *Solanum sanitwongsei* Craib. *Breeding Science*, 44: 301-305.
- Ascencio-Cabral A., Gutierrez-Pulido H., Rodriguez-Garay B. & Gutierrez-Mora A. (2008) Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Scientia Horticulturae*, 118: 155-160.
- Aslam F.N., MacDonald M.V., Loudon P.T. & Ingram D.S. (1990) Rapid cycling *Brassica* species: inbreeding and selection of *Brassica napus* for anther culture ability and an assessment of its potential for microspore culture. *Annals of Botany*, 66: 331-339.
- Atak C., Celik O., Olgun A., Alikamanoğlu S. & Rzakoulieva A. (2007) Effect of magnetic field on peroxidase activities of soybean tissue culture. *Biotechnology & Biotechnology Equipment*, 21: 166-171.
- Avila A.D., Pereyra, S.M. & Argüello J.M. (1998) Nitrogen concentration and proportion of NH_4^+ -N affect potato cultivar response in solid and liquid media. *HortScience*, 33: 336-338.

- Azadi P. & Khosh-Khui M. (2007) Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments. *Electronic Journal of Biotechnology*, DOI:10.2225/vol10-issue4-fulltext-7.
- Azadi P. (2007) Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10: 582-591.
- Azcon-Aguilar C., Padilla I.G., Encina C.L., Azcon R. & Barea J.M. (1996) Mycorrhizal inoculation (*Glomus deserticola*) enhances plant growth and changes root system morphology in micropropagated *Annona cherimola* Mill, Novel Biotechnological Approaches to Plant Production: From Sterile Root to Mycorrhizosphere. Joint COST Meeting 8.21 Pisa, Italy, pp 21.
- Baba A., Hasezawa S. & Syōno K. (1986) Cultivation of Rice Protoplasts and Their Transformation Mediated by *Agrobacterium* Spheroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 27: 463-471.
- Bach A. (1987) The capability of *in vitro* regeneration of various cultivars of *Freesia hybrida*. *Acta Horticulturae*, 212: 715-718.
- Bais H.P. & Ravishankar G.A. (2002) Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 1-34.
- Bais H.P., Sudha G. & Ravishankar G.A. (2000) Putrescine and silver nitrate influence shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. *Journal Plant Growth Regulation*, 19: 238-248.
- Bajaj Y.P.S. (1992) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 20: High-Tech. and Micropropagation IV: Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Baker D.A. (2000) Vascular transport of auxins and cytokinins in *Ricinus*. *Plant Growth Regulation*, 32: 157-160.
- Ballester M.C., San-Jose Vidal N., Ndez-Lorenzo J.L. & Vieitez A.M. (1999) Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. *Annals of Botany*, 83: 619-629.
- Baraldi R., Rossi F. & Lercari B. (1988) *In vitro* shoot development of *Prunus* GF655-2: interaction between light and benzyladenine. *Physiologia Plantarum*, 74: 440-443.
- Baran J.T. & Biswajit G. (2005) Plant Tissue Culture "Basic and Applied" Universities Press, India.
- Barciszewski J., Siboska G., Rattan S.I.S. & Clark B.F.C. (2000) Occurrence, biosynthesis and properties of kinetin (*N⁶-furfuryladenine*). *Plant Growth Regulation*, 32: 257-265.
- Barwale U.B., Kerns H.R. & Widholm J.M. (1986) Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes *via* embryogenesis and organogenesis. *Planta*, 167: 473-481.
- Bauer N., Levani D.L., Mihaljevi S. & Jelaska S. (2002) Genetic Transformation of *Coleus blumei* Benth. Using *Agrobacterium*. *Food Technology and Biotechnology*, 40: 163-169.

- Benbadis A. & de Virville J.D. (1982) Effects of polyethylene glycol treatment used for protoplast fusion and organelle transplantation on the functional and structural integrity of mitochondria isolated from spinach leaves. *Plant Science Letter*, 26: 257-264.
- Bennett I.J., McDavid D.J.A. & McComb A.J. (2003) The influence of ammonium nitrate, pH and indole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus globulus*. *Biologia Plantarum*, 47: 355-360.
- Bennici A., Grifoni T., Schiff S. & Bovelli R. (1997) Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49: 29-33.
- Bertos B., Kojic'-Prodic B., Wade R.C. & Tomic S. (2008) Mechanism of auxin interaction with auxin binding protein (ABP1): A Molecular Dynamics Simulation Study. *Biophysical Journal*, 94: 27-37.
- Beruto M., Curir P. & Debergh P. (1999) Influence of agar on *in vitro* cultures II. Biological performance of *Ranunculus* on media solidified with three different agar brands. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 35: 94-101.
- Bhatia N.P., Bhatia P. & Ashwath N. (2002) *Ex vitro* rooting of micropropagated shoots of *Stackhousia tryonii*. *Biologia Plantarum*, 45: 441-444.
- Bhatia P. & Ashwath N. (2005) Effect of medium pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of tomato. *Biotechnology*, 4:7-10.
- Bhatia P., Ashwatha N. & Midmore D.J. (2005) Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 41: 457-464.
- Bhau B.S. & Wakhlu A.K. (2001) Effect of some antibiotics on the *in vitro* morphogenetic response from callus cultures of *Coryphantha Elephantidens*. *Biologia Plantarum*, 44: 19-24.
- Bhojwani S.S. & Razdan M.K. (1996) *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. 2nd Edn Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, The Netherlands.
- Binns A. & Meins F.Jr. (1980) Chromosome number and the degree of cytokinin habituation of cultured tobacco pith cells. *Protoplasma*, 103: 179-187.
- Bister-Miel F., Guignard J.L., Bury M. & Agier C. (1985) Glutamine as an active component of casein hydrolysate: its balancing effect on plant cells cultured in phosphorus deficient medium. *Plant Cell Reports*, 4: 161-163.
- Blakesley D. & Lenton J.R. (1987) Cytokinin uptake and metabolism in relation to shoot multiplication *in vitro*. In: Jackson M.B., Mantell S.H. & Blake J. (Eds.) *Advances in the Chemical Manipulation of Plant Tissue Cultures*. Monograph 16, British Plant Growth Regulator Group, Bristol.
- Blanco M.D.A., Nieves N., Sanchez M., Borroto C.G., Castillo R., Gonzalez J.L., Escalona M., E.Baez & Z. Hernandez (1997) Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 51: 153-158.
- Bolandi A.R., Branchard M., Alibert G., Serieys H. & Sarrafi A. (1999) Cytoplasmic-nuclear interaction and medium effect for protoplast culture in sunflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57: 189-193.

- Bouman H. & Tiekstra A. (2005) Adaptations of the mineral composition of tissue culture media on the basis of plant elemental analysis and composition of hydroponic substrates. In: Hvostlef-Eide A.K. & Preil W. (Eds.) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, Dordrecht, pp 493-505.
- Bozhkov P.V., Filonova L.H. & Von Arnold S. (2002) A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. *Biotechnology and Bioengineering*, 77: 658-667.
- Bredmose N., Hansen J. & Nielsen J. (1999) Factors intrinsic to the axillary bud determine topographic effects on bud and shoot growth and flower development in *rosa hybrida*. *International Journal of Plant Science*, 160: 819-825.
- Bressan P.H., Kim Y.-J., Hydman S.E., Hasegawa P.M. & Bressan R.A. (1982) Factors affecting *in vitro* propagation of rose. *American Society for Horticultural Science*, 107: 979-990.
- Burge G. K., Morgan E. R. & Seelye J.F. (2002) Opportunities for synthetic plant chimera breeding: Past and future. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 13-21.
- Burritt D.J. & Leung D.W.M. (2003) Adventitious shoot regeneration from *Begonia erythrophylla* petiole sections is developmentally sensitive to light quality. *Physiologia Plantarum*, 118: 289-296.
- Capitani F. & Altamura M.M. (2004) Exogenous calcium enhances the formation of vegetative buds, flowers and roots in tobacco pith explants cultured in the absence of exogenous hormones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77: 1-10.
- Carelli B.P., Echeverrigaray S. (2002) An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. *Scientia Horticulturae*, 92: 69-74.
- Carlson P.S. & Chaleff R.S. (1974). Heterogeneous association of cells formed *In vitro*. In: L. Ledoux (Ed.), *Genetic Manipulations with Plant Materials*. Plenum Press, New York, USA. pp 245-261.
- Carlson P.S., Smith H.H. & Dearing R.D. (1972) Parasexual interspecific plant hybridization. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA. 69: 2292-2294.
- Carman J.G. & Campbell W.A. (1988) Factors affecting somatic embryogenesis in wheat. In Bajaj Y.P.S. (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Crops II*. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Cassells A.C., Minas G. & Long R. (1980) Culture of *Pelargonium* hybrids from meristems and explants: Chimera and beneficially-infected varieties. In: D.S. Ingram & J.P. Helgeson (Eds.), *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*. Blackwell, Oxford, pp 125-130.
- Celenza J., Grisafi P. & Fink G. (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, 9: 2131-2142.
- Celestino C., Luisa M., Toribio M., Antonio J.A. & Bardasano J. (1998) Influence of 50 Hz electromagnetic fields on recurrent embryogenesis and germination of cork oak somatic embryo. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54: 65-69.

- Chabukswar M.M. & Deodhar M.A. (2006) Restoration of rooting competence in a mature plant of *Garcinia indica* through serial shoot tip grafting *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 108: 194-199.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W. & Prasher D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263: 802-80.
- Chandler S.F. & Dodds J.H. (1983) The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasidine in callus cultures of *Solanum laciniatum*. *Plant Cell Report*, 2: 105-108.
- Chandra S., Bandopadhyay R., Kumar V. & Chandra R. (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32:1199-1205.
- Charriere F., Sotta B., Miginiac E. & Hahne G. (1999) Induction of adventitious shoots or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiology & Biochemistry*, 37: 751-757.
- Chawla H.S. (2000) Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers, Inc, USA.
- Chazen O., Hartung W. & Neumann P.M. (1995) The different effects of PEG 6000 and NaCl on leaf development are associated with differential inhibition of root water transport. *Plant, Cell & Environment*, 18: 727-735.
- Chen C. (2005) Fluorescent lighting distribution for plant micropropagation. *Biosystems Engineering*, 90: 295-306.
- Chen J. T. & Chang W.C. (2003) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid enhanced direct somatic embryogenesis from *Oncidium* leaf cultures. *Biologia Plantarum*, 46: 455-458.
- Chen Z., Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V. & Sondahl M.R. (1990) Handbook of Plant Cell Culture Vol. 6. Perennial Crops. McGraw-Hill Publishing Company, New York, USA.
- Cheong, E.J. & Pooler, M.R. (2004) Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus indica* cv. February Pink. *Plant Cell Reports*, 11: 810-815.
- Choffe K.L., Victor J.M.R., Murch S.J. & Saxena K. (2000) *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* L.: Direct somatic embryogenesis and indirect shoot organogenesis in petiole culture. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 36: 30-36.
- Chu C. (1978) The N 6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Peking, Beijing, China. pp. 43-50.
- Chueca M.C., Cauderon Y. & Tempe J. (1977) Technique d'obtention d'hybrides Ble tendre X *Aegilops* par culture *in vitro* d'embryons immatures. *Annual Amelior Plant*, 27: 539-547.
- Clayton D., Gilmar Z.R. & Miguel G.P. (2003) Effect of photosynthetically active radiation on the *in vitro* initial development of banana cultures. *Agrociência*, 9: 175-176.
- Cleland R.E. (2004) Auxin and cell elongation. In: Davies P.J. (Ed.) Plant Hormones, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 204-220

- Cocking E.C. (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187: 962-963.
- Collin H.A. & Edwards S. (1998) *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Cooke T.T., Poli D.B., Szeftien A.F. & Cohen J.D. (2002) Evolutionary pattern in auxin action. *Plant Molecular Biology*, 49: 319-338.
- Córdoba-Sellés M., García-Rández A., Alfaro-Fernández A. & Jordà-Gutiérrez C. (2007) Seed transmission of pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*, 91: 1250-1254.
- Costa M.G.C., Nogueira F.T.S., Figueira M.L., Otoni W.C., Brommonschenkel S.H. & Cecon P.R. (2000) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Plant Cell Reports*, 19: 327-332.
- Couée I., Hummel I., Sulmon C., Gouesbet G. & El-Amrani A. (2004) Involvement of polyamines in root development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 1-10.
- D'Amate F., Bennici A., Cionini P.G., Baroncelli S. & Lupi M.C. (1980) Nuclear fragmentation followed by mitosis as mechanism for wide chromosome number variation in tissue cultures, its implications for plant regeneration. In: Sala F., Parisi B., Cella R., Ciferri O. (eds) *Plant Cell Cultures: Results and Perspectives*. Elsevier North Holland, Amsterdam, The Netherlands. pp 67-72.
- Dale P.J. & Cheyne V.A. (1993) The elimination of clover diseases by shoot tip culture. *Annals of Applied Biology*, 123: 25-32.
- Dan Y. (2008) Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 44: 149-161.
- Dang R. & Donnelly D.J.N. (1993) *In vitro* hardening of new raspberry by CO₂ enrichment and reduced medium sucrose concentration. *Horticultural Science*, 28: 1048-1051.
- Dansa K.E. & Ford-Lloyd B.V. (2003) Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm. *Plant Cell Reports*, 21: 718-725.
- Datta S.K., Peterhans A., Datta K. & Potrykus I. (1990) Genetically engineered fertile Indica rice recovered from protoplasts. *Bio/Technology*, 8: 736-740.
- Devey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C. (2005) Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 23: 131-171.
- Davies P.J. (1995) *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd ed., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Davies P.J. (2004) Plant Hormones: Their Nature, Occurrence and Function. In: Davies P.J. (Ed.) *Plant Hormones*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp 1-15.
- Davies P.J. (2004b) Regulatory factors in hormone action: Level, location and signal transduction. In: Davies P.J. (ed.) *Plant Hormones*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 16-35.
- De Klerk G.J. & Wijnhoven F. (2005) Water retention capacity of tissue cultured plants. *Propagation of Ornamental Plants*, 5: 14-18.

- De Klerk G.J., Hanecak ova J. & Jásik J. (2008) Effect of medium-pH and MES on adventitious root formation from stem disks of apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95: 285-292.
- De Klerk G.J.M. & Calamar A. (2002) Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 207-212.
- De Klerk G.J.M. & Calamar A. (2002) Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 70: 207-212.
- De La Pena A., Lorz H. & Schell J. (1987) Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature*, 325:274-276.
- De Riek L., Piqueras A. & Debergh P.C. (1997) Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora* Jan. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 269-278.
- De Schepper S., Leus L., Eeckhaut T., Van Bockstaele E., Debergh P. & De Loose M. (2004) Somatic polyploid petals: regeneration offers new roads for breeding Belgian pot azaleas. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 183-188.
- Debergh P. & Maene L. (1981) Some aspects of stock-plant preparation for tissue culture propagation. *Acta Horticulturae*, 166: 21-23.
- Debergh P.C. & Read P.E. (1991) Micropropagation. In: Debergh P.C. & Zimmerman R.H. (Eds) Micropropagation. Kluwer Academic Publisher. The Netherlands. pp. 1-13.
- DeCook R., Lall S., Nettleton D. & Howell S. (2006) Genetic Regulation of Gene Expression During Shoot Development in Arabidopsis. *Genetics*, 172: 1155-1164.
- DeKlerk G-J. (2002) Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 38: 415- 422.
- Delaat M.M. & Blaas J. (1987) An improved method for protoplast micro-injection suitable for transfer of entire plant chromosomes. *Plant Science*, 50: 161-169.
- DeLaat.A.M. & Blaas J. (1987) cytoplasmic organelles into plant protoplasts. *Plant Sciences*, 50: 161-169.
- Delanomarco J.B. & Picazo I. (1994) Effect of growth regulators on *in vitro* propagation of *Ficus benjamina* cv. Exotica. *Biologia Plantarum*, 36: 167-173.
- Dewitte W., Riou-Khamlichi C., Scofield S., Healy J.M.S., Jac-qmard A., Kilby N.J. & Murray J.A.H. (2003) Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell*, 15: 79-92.
- Dhawan V. & Saxena S. (2005) Cloning Forestry Species. In: Plant Biotechnology and Molecular Markers. Srivastava P.S., Narula A. & Srivastava S. (Eds.) Anamaya Publishers, New Delhi, India. pp 183-194.
- Dickinson J.R., Forsyth C. & Van Staden J. (1986) The role of adenine in the synthesis of cytokinins in tomato plants and in cell-free root extracts. *Plant Growth Regulation*, 4: 325-334.
- Dimassi K., Chouliaras V., Diamantidis G. & Therios I. (2003) Effect of iron and auxins on peroxidase activity and rooting performance of three citrus rootstocks *in vitro*. *Journal of Plant Nutrition*, 26: 1023-1034.
- Dix P.J. (1990) Plant Cell Line Selection. VCH, Weinheim, Holland.

- Dixon R.A. & Gonzales R.A. (1994) *Plant Cell Culture A Practical Approach* 2nd edn. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Dixon R.R. (1985) Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: Dixon, R.A. (Ed.) *Plant cell culture: a practical approach*. Oxford: Irl Press. pp 1-20.
- Dodeman V.L., Ducreux G. & Kreis M. (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1493-1509.
- Donnelly D.J., Coleman W.K. & Coleman S.E. (2003) Potato microtuber production and performance: A review. *American Journal of Potato Research*, 80:103-115.
- Druart P.H. (1988) Regulation of axillary branching in micropropagation of woody fruit species. *Acta Horticulturae*, 227: 369-380.
- Duncan R.R. (1997) Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Advances in Agronomy*, 58: 201-240.
- Economou A.S. & Read P.E. (1987) Light treatments to improve efficiency on *in vitro* propagation systems. *HortScience*, 22: 751-753.
- Emek Y. & Erdag B. (2007) *In vitro* propagation of *Gladiolus anatolicus* (Boiss) Stapf. *Pakistan Journal of Botany*, 39: 23-30.
- Emons A.M.C., Samallo-Droppers A. & Van Der Toorn C. (1993) The influence of sucrose, mannitol, L-proline, abscisic acid and gibberellic acid on the maturation of somatic embryos of *Zea mays* L. from suspension cultures. *Journal of Plant Physiology*, 142: 597-604.
- Engelmann F. & Engels J.M.M. (2002) Technologies and strategies for ex situ conservation. In: Engels, J.M.M., Rao R.V, Brown, A.H.D. & Jackson, M.T. (Eds.) *Managing Plant Genetic Diversity*. Wallingford and Rome, CAB International and IPGRI. pp 89-104.
- Enjalric F., Carron M.P. & Lardet L. (1988) Contamination of primary cultures in tropical areas: The case of *Hevea Brasiliensis*. In: Bacterial and bacteria-like contaminants of plant tissue cultures. ISHS Acta Horticulturae 225 <http://www.actahort.org/books/225/index.Htm>.
- Estrada-Luna A.A., Davies F.T. & Egilla J.N. (2000) Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium gualava* L.) during ex vitro acclimatization and plant establishment. *Mycorrhiza*, 10: 1-8.
- Etienne H. & Berthouly M. (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 215-231.
- Eymar E., Alegre J., Toribio M. & L'opez-Vela D. (2000) Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 57-65.
- Fal M.A., Majada J.P., Gonz'alez A. & S'anchez R.T. (1999) Differences between *Dianthus caryophyllus* L. cultivar in *in vitro* growth and morphogenesis are related to their ethylene production. *Plant Growth Regulation*, 27: 131-136.
- Faure J-E. (2001) Double fertilization in flowering plants: Discovery, study methods and mechanisms C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences 324: 551-558.

- Feher A., Pasternak T., Otvos K., Miskolezi P. & Dudits D. (2002) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: A review. *Biologia*, 57: 5-12.
- Feher A., Pasternak T.P. & Dudits D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 201-228.
- Felle H.H. (2001) pH: Signal and messenger in plant cells. *Plant Biology*, 3: 577-591.
- Fonnesbech A., Fonnesbech M. & Bredmose N. (1979) Influence of cytokinins and temperature on development of *Asparagus plumosus* shoot tips *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 45: 73-76.
- Francis D. & Sorrell D.A. (2001) The interface between the cell cycle and plant growth regulators: A mini review. *Plant Growth Regulation*, 33: 1-12.
- Friml J. (2003) Auxin transport – shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 1-6.
- Fujiwara K., Kozai T. & Nakajo Y. (1989) Effects of closures & vessels on light intensities in plant tissue culture vessels. *Journal of Agricultural Meteorology*, 45: 143-149.
- Funada R., Kubo T., Tabuchi M., Sugiyama T. & Fushitani M. (2001) Seasonal variations in endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the cambial region of *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. stems in relation to earlywood/latewood transition and cessation of tracheid production. *Holzforschung*, 55: 128-134.
- Furner I.J., King J. & Gamborg O.L., (1978) Plant regeneration from protoplasts isolated from a predominantly haploid suspension culture of *Datura innoxia* (Mill). *Plant Science Letter*, 11: 169-176.
- Gahan P.B. & George E.F. (2008) Adventitious Regeneration. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G.J. (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology*, 3rd Edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 355-402.
- Gamborg O. L. (2002) Plant tissue culture. Biotechnology. Milestones. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38: 84-92.
- Gamborg O.L., Miller R.A. & Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.
- Ganapathi T.R., Srinivas L., Supranna P. & Bapat V.A. (2001) Regeneration of plants from alginate – encapsulated somatic embryos of banana cv. Rasthali (*Musa* s pp AAB group). *In vitro Cellular and Developmental Biology--Plant*, 37: 178-181.
- Garcia-Luis A., Molina R.V., Varona V., Castello S. & Guardiola J.L. (2006) The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration *in vitro* in epicotyl cuttings of *Troyer citrange*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 85: 137-144.
- Gavazzi G.C., Tonelli G., Todesco E., Arreghini F., Raffaldi F., Vecchio G., Barbuzzi M.G & Sala F. (1987) Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 74: 733-738.
- Geier T. (1986) Factors affecting plant regeneration from leaf segments of *Anthurium scherzerianum* Schott (Araceae) cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 6: 115-125.

- Gemas V. & Bessa A. (2006) Influence of various carbohydrates in shoot development in nodal culture of Guinean *Anacardium occidentale* genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 85: 103-108.
- George E.F. & Davies W. (2008) Effects of the Physical Environment. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology*, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 423-469.
- George E.F. & De Klerk G-J. (2008) The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology*, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 65-114.
- George E.F. & Debergh P.C. (2008) Micropropagation: Uses and Methods. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology*, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 29-64.
- George E.F. (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology*, 2nd edn. Exegetics limited, UK.
- George E.F. (2008) Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology*, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 1-29.
- Gerendas J., Polacco J.C., Freyeremuth S.K. & Sattelmacher B. (1999) Significance of nickel for plant growth and metabolism. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 162: 241-256.
- Gertsson U.E. (1988) Influence of macronutrient composition, TIBA and dark treatment on shoot formation and nitrogen content in petiole explants of *Seneciohybridus*. *Journal of Horticultural Science*, 63: 497-502.
- Gislerod H.R., Selliah R., Ayeh K.Q. & Hvoslef-Eide A.N. (2005) Macro- and micronutrient nutrition of plants in greenhouses, hydroponic systems, and *in vitro* culture on gelled media. In: Kathrine A., Hvoslef-Eide & Preil W. (Eds.) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer-Verlag, Berlin, Germany-Verlag, Germany. pp. 475-492.
- Godfrey J. & Cross R. (2005) Photoautotrophic micropropagation of *Banksia* final Report to the Australian Flora Foundation, http://www.aff.org.au/Cross_Banksia_final.pdf
- Goodman E.M., Greenebaum B. & Morron T.M. (1995) Effects of electromagnetic fields on molecules and cells. *International Review of Cytology*, 158: 279-325.
- Grimes H.D. & Hodges T.K. (1990) The inorganic $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of Indica rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*, 136: 362-367.
- Grout B.W.W. (1988) Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and the stresses of transplanting. *Acta Horticulturae*, 230: 129-135.
- Grout B.W.W. (1999) Meristem-tip culture for propagation and virus elimination. In: Hall R D (Ed.): *Methods in Molecular Biology, Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA.

- Guan H.Y., Huisman P. & De Klerk, G.-J. (1997) Rooting of apple stem slices *in vitro* is affected by indoleacetic-acid depletion of the medium. *Angewandte Botanik*, 71: 80-84.
- Gunson H.E. & Spencer-Phillips P.T.N. (1994) Latent bacterial infections: Epiphytes and endophytes as contaminants of micropropagated plants. In: Lumsden P.J., Nicholas J.R. & Davies W.J. (Eds.) *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Kluwer, Dordrecht, Germany. pp 379-396.
- Gürel S., Gürel E. & Kaya Z. (2002) Protoplast fusion in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Turkish Journal of Biology*, 26: 163-170.
- Hall R.D. (1999) An introduction to plant-cell culture: pointers to success. In: Hall R.D. (Ed.) *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, Ottawa, NJ, USA. pp 1-19.
- Hao Y.J. & Deng X.X. (2002) Stress treatments and DNA methylation affect somatic embryogenesis from citrus callus. *Acta Botanica Sinica*, 44: 673-677.
- Harris R. & Mason E. (1983) Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. *Canadian Journal of Plant Science*, 63: 311-316.
- Harry I.S. & Thorpe T.A. (1990) Clonal Propagation of Woody Species. In: Hall R.D. (Ed.) *Methods in Molecular Biology, Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA. pp 149-158.
- Hart J.W. (1988) *Light and Plant Growth*. Unwin Hyman, London, UK.
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T. & Geneve R.L. (2002) *Plant Propagation Principles and Practices*. 7th. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.
- Hartung W. & Abou-Mandour A.A. (1996) A beneficial role of abscisic acid for regenerates of *Ruta graveolens* ssp *divaricata* (Tenore) Gams suffering from transplant shock. *J. Appl. Bot.-Angewandte Botanik*, 70: 221-223.
- Hazarika B. N. (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, 85: 12-25.
- Hazarika B.N. (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108: 105-120.
- Heinz D.J. & Mee G.W.P. (1971) Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. *American Journal of Botany*, 58: 257-262.
- Heller R. (1955) Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives *in vitro*. *Ann. Sci. Natl. Biol. Veg.*, 14: 1-223.
- Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y., Kanda M. (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 7783-7788.
- Hirota N., Nakagawa J & Kitazawa K. (1999) Effects of a magnetic field on the germination of plants. *Journal of Applied Physics*, 85: 5717-5719.
- Holdgate D.P. (1977) Propagation of ornamentals by tissue culture. In: Reinert J. & Bajaj Y.P.S. (Eds.) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 18-43.
- Homffann K., Verbeek M., Romano A., Dullemans A.M., vanden Heuvel J.F.J.M. & van der Wilk F. (2001) Mechanical transmission of poleroviruses. *Journal of Virological Methods*, 91:197-201.

- Hoque A. & Arima S. (2002) Overcoming phenolic accumulation during callus induction and *in vitro* organogenesis in water chestnut (*Trapa japonica* Flerov). *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38: 342-346.
- Hossain B., Hirata N., Nagatomo Y., Akashi R. & Takaki H. (1997) Internal zinc accumulation is correlated with increased growth in rice suspension culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 16: 239-24.
- Huang L.-C., Lius S., Huang B.-L., Murashige T., Mahdi F.M. & Van Gundy R. (1992) Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by Repeated Grafting of Shoot Tips onto Juvenile Rootstocks *in vitro*, model for phase reversal of trees. *Plant Physiology*, 98: 166-173.
- Huetteman C.A. & Preece J.E. (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33: 105-119.
- Isac V. (2008) Research on ex vitro rooting of raspberry microcuttings obtained from *in vitro* micropropagation. *Lucrări științifice. U.Ș.A.M.V.B., Seria B*, vol. LI, 339-343.
- Islam Md.T., Philibert D.D. & Keller E.R.J. (2005) Influence of explant, temperature and different culture vessels on *in vitro* culture for germplasm maintenance of four mint accessions *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 123-130.
- Ivanova M. & Van Staden J. (2010) Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans *Plant Growth Regulation*, 60: 143-150.
- Jackson J.A. & Dale P.J. (1988) Callus induction, plant regeneration and an assessment of cytological variation in regenerated plants of *Lolium multiflorum* L. *Journal of Plant Physiology*, 132: 351-355.
- Jackson M.B. (2003) Aeration stress in plant tissue cultures. *Bulg. Journal of Plant Physiology*, Special Issue 2003: 96-109.
- Jackson M.B., Saker L.R., Crisp C.M., Else M.A. & Janowiak F. (2003) Ionic and pH signalling from roots to shoots of flooded tomato plants in relation to stomatal closure. *Plant and Soil*, 253: 103-113.
- Jain N. & Barbbar S.B. (2002) Gum katira a cheap gelling agent for plant tissue culture media. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 223-229.
- Jain S.M. (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118: 153-166.
- Jaizme-Vega M.C., Rodriguez-Rovero A.S., Marin Hermoso C. & Declerck S. (2003) Growth of micropropagated bananas colonized by root-organ culture produced arbuscular mycorrhizal fungi entrapped in Ca-alginate beads, *Plant and Soil*, 254: 329-335.
- Jambhale N.D., Patil S.C., Jadhav A.S., Pawar S.V. & Waghmode B.D. (2001) Effect of number of subcultures on *in vitro* multiplication of four banana clones. *Infomusa*, 10: 138-39.
- James C. (2015) Preview: Global Status of Commercialized Transgenic Crops. ISAAA Briefs 30, ISAAA: Ithaca, NY. USA.
- Jayasankar S. (2005) Variation in Tissue Culture. In: Trigiano R.N. & Gray D.J. (Eds) *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press Boca Raton, Florida, USA. pp 301- 311.

- Jensen C.J. (1974) Chromosome doubling techniques in haploids. In: Kasha K.J. (Ed) Haploids in higher plants: advances and potential. University of Guelph Press, Guelph, Ontario, Canada. pp 153-193.
- Jensen C.J. (1986) Haploid induction and production in crop plants. In: de Gryuyter Horn W. (Ed.) Genetic Manipulation in Plant Breeding. Proc. Int. Symp. EUCARPIA, Sept. 8-13, 1985, Berlin, Germany. Berlin - New York.
- Jeong B.R., Fujiwara K. and Kozai T. (1995) Environmental control and photoautotrophic micropropagation. *Horticultural Reviews*, 17: 125-172.
- Jheng F.Y., Do Y.Y., Liauh Y.W., Chung J.P. & Huang P.L. (2006) Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium 'Gower Ramsey'* by adjusting carbohydrate sources. *Plant Science*, 170: 1133-1140.
- Jimenez V.M., Castillo J., Tavares E., Guevara E. & Montiel M. (2006) *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 389-395.
- Jimenez V.M. & Bangerth F. (2001) Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiologia Plantarum*, 111: 389-395.
- Johansson L.B., Calleberg E., Gedin A. (1990) Correlations between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of *Anemone canadensis*. *Physiologia Plantarum*, 80: 243-9.
- Johnson A. & Veilleux R. (2001) Somatic hybridization and application in plant breeding. In: J. Janick (Ed.) Plant breeding reviews, vol. 20. John Wiley & Sons, Inc. pp 167-225.
- Jones E.D. (1988) A current assessment of *In vitro* culture and other rapid multiplication methods in North America and Europe. *American Potato Journal*, 65: 209-220.
- Jones L. (1991) Biotechnological Innovations in Crop Improvement. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, UK.
- Jones M.G.K., Dunckley R., Steele S., Karp A., Gibson R., Fish N., Valkonen J., Poutala T. & Pehu E. (1990) Transfer of resistance to PLRV, PVX and PVY from *S. brevidens* to potato by somatic hybridization: characterisation and field evaluation. In: Nijkamp H.J.J (Ed.), Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. pp 286-292.
- Joyce S.M. & Cassells A.C. (2002) Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 125-137.
- Kadleček P., Tichá I., Čapková V. & Schäfer C. (1998) Acclimatization of micropropagated tobacco plantlets. In: Garab G. (Ed.): Photosynthesis: Mechanisms and Effects. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht - Boston - London Vol. V. pp 3853-3856.
- Kaeppeler S.M., Kaeppeler H.F., Rhee Y. (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 43: 179-188.
- Kameya T. & Hinata K. (1970) Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. *Japanese journal of breeding*, 20: 82-87.

- Kao K.N. & Michayluk M.R. (1974) A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 115: 355-367.
- Kaparakis G. & Alderson P.G. (2002) Influence of high concentration of cytokinins on the production of somatic embryo by germination seeds of tomato, aubergine and pepper. *Journal of Microencapsulation Science & Biotechnology*, 77: 186-190.
- Kaparakis G. & Alderson P.G. (2003) Differential callus type formation by auxins and cytokinin in *in vitro* cultures of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Biosystems*, 137: 275-280.
- Kapoor R., Sharma D. & Bhattacharya K.K. (2008) Arbuscular mycorrhizae in micropropagation system and their potential applications. *Scientia Horticulturae*, 116: 227-230.
- Karam N.S. & Al-Maghrabi A. (2000) Direct shoot regeneration and microtuberization of wild olive (*Olea persicum* Mill.) using seedling tissue. *Scientia Horticulturae*, 86: 235-240.
- Kartsonas E. & Papafofis M. (2007) Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus eubonia* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90:111-116.
- Keller W.A. & Armstrong K.C. (1977) Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther cultures. *Canadian Journal of Botany*, 55: 1383-1388.
- Keskitalo M., Pohio A., Savela M.L., Valkonen J.P.T., Simon J. & Pehu E. (1998) Alterations in growth of tissue-cultured tansy (*Tanacetum vulgare* L.) treated with antibiotics. *Annals of Applied Biology*, 133: 281-296.
- Kevers C., Gaspar T. & Demmes J. (2002) The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng* *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 181-188.
- Keyes G.J., Deaton W.R., Collins G.B. & Legg P.D. (1981) Hybrid vigour in callus tissue cultures and seedlings of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Heredity*, 72: 172-174.
- Kintzios S., Drossopoulos J.B., Shortsiannis E. & Peppes D. (2000) Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. *Scientia Horticulturae*, 85: 137-144.
- Kintzios S., Stavropoulou E. & Skamneli S. (2004) Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of *in vitro* dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). *Plant Science*, 167: 655-664.
- Kirkham M.B. & Holder P.L. (1981) Water osmotic and turgor potentials of kinetin-treated callus. *HortScience*, 16: 306-307.
- Kitaya Y., Fukuda O., Kozai T. & Kirdmance C. (1995) Effects of light intensity and lighting direction on the photoautotrophic growth and morphology of potato plantlets *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 62: 15-24.
- Kitto S.K. & Janick J. (1982) Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. *HortScience*, 17: 488.

- Kitzinger E.M., Jansen Van Vuuren R., Woodward B., Rong I.H., Spreth M.H. & Slabbert M.M. (1997) Elimination of external and internal contaminants in rhizomes of *Zantedeschia aethiopica* with commercial fungicides and antibiotics. In: Cassells, A.C. (Ed.) Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. pp 61-167.
- Klapheck S., Grosse W. & Bergmann L. (1982) Effect of sulphur deficiency on protein synthesis and amino acid accumulation in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Z. Pflanzenphysiol*, 108: 235-245.
- Kleinhofs A. & Behki R. (1977) Prospect for plant genome modification by nonconventional methods. *Annual Review of Genetics*, 11:79-101.
- Knudson C. (1946) A new nutrient solution for orchid seed germination. *American Orchid Society Bulletin*, 15: 214-17.
- Ko S.W., Wong C.K. & Woo S.C. (1983) A simplified method of embryo culture in *Oryza sativa* L. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 24: 97-101.
- Koch K.E. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology & Molecular Biology*, 47: 509-540.
- Kodym A., Zapata-Arias F.J. (2001) Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66: 67-71.
- Koens K.B., Nicoloso F.T., Van Vliet T.B., Hartevelde M., Boot C.J.M., Van Iren F., Mulder P., Libbenga K.R. & Kijne J.W. (1995) Kinetics of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid content in an auxin-dependent suspension culture of *Nicotiana tabacum* cells. *Journal of Plant Physiology*, 147: 383-390.
- Kohli A., Leech M., Vain P., Laurie D.A., Christou P. (1998) Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proceeding of National Academy of Science, USA*, 95: 7203-7208.
- köse C. (2007) Effects of direct electric current on adventitious root formation of a grapevine rootstock. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58: 120-123.
- Kott L.S. & Beversdorf W.D. (1988) Enhanced plant regeneration from microspore derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23: 187-192.
- Kozai T. & Iwanami Y. (1988) Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L) in tissue culture during the preparation stage. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 57: 279-288.
- Kozai T. (1991) Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh, P.C. & Zimmerman, R.M. (Eds.) Micropropagation, Technology and Application. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. pp 447-469.
- Kozai T., Kubota C. & Jeong B.R. (1997) Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51: 49-56.
- Kozai T., Oki H. & Fujiwara K. (1987) Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue-

- cultured Cymbidium plantlets during the preparation stage. Symp. Florizel on Plant Micropropagation in Hort. Ind. pp 135-141.
- Kozai T., Watanabe K. & Jeong B.R. (1995) Stem elongation and growth of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* in response to photosynthetic photon flux, photoperiod and difference in photoperiod and dark period temperatures. *Scientia Horticulturae*, 64: 1-9.
- Kranz E. & Lorz H. (1993) *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. *Plant Cell*, 5: 739-746.
- Krens F.A., Molendijk L., Wallens G.J. & Schilperoort R.A. (1982) *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature*, 296: 72-74.
- Krishna H., Sairam R.K., Singh S.K., Patel V.B., Sharma R.R., Grover M., Nain L. & Sachdev A. (2008) Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Scientia Horticulturae*, 118: 132-138.
- Kritzing E.M., van Vuuren R.J., Woodward B., Rong J.H., Spreeth M.H. & Slabbert M.M. (1997) Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. In: Cassells A.C. (Ed.) International Symposium on Bacterial and Bact. 1997, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, pp 161-168.
- Krogstrup P., Find J.L., Gurskov D.J. & Kristensen M.M.H. (2005) Micropropagation of Socotran fig, *Dorstenia gigas* Serweinf. Ex. Balf. F.—a threatened species, endemic to the island of Socotra, Yemen. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant* 41: 81-86.
- Kromer K. & Kukulczanka K. (1985) *In vitro* cultures of meristem tips of *Canna indica* L. *Acta Horticulturae*, 167: 279-285.
- Kumar S., Narula A., Sharma M. P. & Srivastava P.S. (2003) Effect of copper and zinc on growth, secondary metabolite content and micropropagation of *Tinospora cordifolia* A medicinal plant. *Phytomorphology*, 53: 79-91.
- Lall S., Nettleton D., DeCook R., Che P. & Howell S.H. (2004) Quantitative trait loci associated with adventitious shoot formation in tissue culture and the program of shoot development in arabidopsis. *Genetics*, 167: 1883-1892.
- Lambe P., Mutambel H.S.N., Fouche J.G., Deltour R., Foidart J.M. & Gaspar T.H. (1997) DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression. *In vitro Cellular and development Biology - Plant*, 33: 155-162.
- Langford P.J. & Wainwright H. (1987) Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Annals of Botany*, 60: 633-640.
- Langhansova L., Konradova H. & Vanek T. (2004) Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos, *Plant Cell Reports*, 22: 725-730.
- Lardet L., Aguilar M.E., Michaux-Ferriere N. & Berthouly N. (1998) Effect of strictly plant-related factors on the response of *Hevea brasiliensis* and *Theobroma cacao* nodal explants cultured *in vitro*. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant* 4: 34-40.
- Larkin P.J. & Scowroft W.R. (1981) Somaclonal variation—a novel source of variation from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60: 197-214.

- Larkin P.J., Brettell R.I.S., Ryan S.A., Davies P.A., Palotta W.A., Scowcroft W.R. (1985) Somaclonal variation: impact on plant biology and breeding strategies. In: Zaitlin M., Day P., & Hollaender A. (Eds.) *Biotechnology in Plant Science*, Academic Press, New York, USA. pp 83-100.
- Last D.I. & Brettell I.S. (1990) Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Reports*, 9: 14-16.
- Laureys F., Dewitte W., Witters E., Van Montagu M., Inzé D. & Van Onckelen H. (1998) Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters*, 426: 29-32.
- Lazcano C.A., Davies F.T., Duray S.A. & Estrada-luna A. (1997) Effect of IBA and wounding on adventitious root formation of *Opuntia s pp* Cladodes. Fifth International Congress of Cactus Pear and 7th Mexican Congress of Nopales. Monterrey, Mexico, September 5-9.
- Lazzeri P.A., Hildebrand D.F., Sunega J., Williams E.G. & Collins G.B. (1988) Soybean somatic embryogenesis: interactions between sucrose and auxin. *Plant Cell Reports*, 7: 517-520.
- Lee M. & Phillip R.L. (1988) The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 413-437.
- Lee M. & Phillips R.L. (1987) Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. *Genome*, 29: 122-128.
- LeGuen Le-Sasen F., Hourmant F., Esnqul T. & Chauvin J.E. (2002) *In vitro* bulb development in Shalot (*Allium cepa* L.) Aggregatum group. Effect of antigibberelic, sucrose and ligh. *Annals of Botany*, 89: 419-425.
- Leifert C. & Cassells A.C. (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant* 37: 133-138.
- Leifert C., Murphy K.P. & Lumsden P.J. (1995) Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews Plant Science*, 14: 83-109.
- Leljak-Levanic D., Bauer N., Mihaljevic S. & Jelaska S. (2004) Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Reports*, 23: 120-127.
- Lemos E.E.P. & Blake J. (1996) Micropropagation of juvenile and adult *Annona squamo. a*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 46: 77-79.
- Leshem B. (1983) Growth of carnation meristems *in vitro*: Anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. *Annals Botany*, 52: 413-415.
- Lian M.L., Murthy H.N. & Paek K.Y. (2002) Effects of light emitting diodes on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro'. *Scientia Horticulturae*, 94: 365-370.
- Lindsey K. & Jones M.G.K. (1990) *Plant Biotechnology in Agriculture*. Prentice- Hall, NJ, USA.
- Ling D.X., Luckett D.J. & Darvey N.L. (1991) Low-dose gamma irradiation promotes wheat anther culture response. *Australian Journal of Botany*, 39: 467-474.
- Liu T.A., Hsu N-W. & Wu R-Y. (2005) Control of leaf-tip necrosis of micropropagated ornamental statice by elimination of endophytic bacteria. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 41: 546-549.

- Llorente D.E. & Apostolo N.M. (1998) Effect of different growth regulators and genotypes on *in vitro* propagation of jojoba. *NZ Journal Crop Horticultural Science*, 26: 55-62.
- Logemann J. & Schell J. (1993) The impact of biotechnology on plant breeding, or how to combine increases in agricultural productivity with an improved protection of the environment. In: Chet J. (Ed.), *Biotechnology in Plant Disease*. Wiley-Liss, New York, USA, pp 1-14.
- Loreti F., Morini S. & Concetti S. (1988) Effect of potassium and nitrogen concentration on growth of peach shoots cultured *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 227: 311-317.
- Lorz H. & Scowcroft W.R. (1983) Variability among plants and their progeny regenerated from protoplasts of Salsu heterozygotes of *Nicotiana tabacum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 66: 67-75.
- Loschiavo F., Pitto L., Guiliano G., Tori G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Vergara R., Orselli S., Terzi M. (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*, 77: 325-331.
- Loureiro J., Capelo A., Brito G., Rodriguez E., Silva S., Pinto G. & Santos C. (2007) Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 51: 7-14.
- Lucchesini M., Mensuali-Sodi A., Massai R. & Gucci R. (2001) Development of autotrophy and tolerance to acclimatization of *Myrtus communis* transplants cultured *in vitro* under different aeration. *Biologia Plantarum*, 44: 167-174.
- Lucyszyn N., Quoirin M., Hornma M.M. & Sierakowski M.-R. (2007) Agar/galactomannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. *Biologia Plantarum*, 51: 173-176.
- Lucyszyn N., Quoirin M., Kochler H.S., Reicher F. & Sierakowski M.R. (2006) Agar/galactomannan blends for strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne) cv. Pelican micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 107: 358-364.
- Luo J., Wawrosch C., Kopp B. (2009) Enhanced micropropagation of *Dendrobium huoshanense* C.Z. Tang et S.J. Cheng through protocorm-like bodies: The effects of cytokinins, carbohydrate sources and cold pretreatment. *Scientia Horticulturae*, 123: 258-262.
- Luo Z. & Wu R. (1988) A simple method for the transformation of rice via the pollen tube pathway. *Plant Molecular Biology Reporter*, 6: 165-74.
- Lynch J., Polito V.S. & Lauchli A. (1989). Salinity stress increases cytoplasmic Ca^{2+} activity in maize root protoplasts. *Plant Physiology*, 90: 1271-1274.
- Machakova I., Zazimalova E. & George E.F. (2008) Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G.-J. (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology*, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 175-205.
- Mandal A.K.A., Chakrabarty D. & Datta S.K. (2000) Application of *In vitro* techniques in mutation breeding of chrysanthemum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60: 33-38.

- Manly J., Slovin J.P. & Cohen J.D. (2004) Auxin biosynthesis and metabolism. In: Davies P.J. (Ed.): Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action. Springer-Verlag, Berlin, Germany-Kluwer Academic Publisher, New York, Dordrecht pp 36-62.
- Maraschin S.F., de Priester W., Spalink H.P. & Wand M. (2005) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1711-1726.
- Marcia O.M., Melo M. & Appezzato-da-Gloria B. (2001) Histological Analysis of the Callogenesis and Organogenesis from Root Segments of *Curcuma zedoaria* Roscoe. *Brazilian Archive of Biology and Technology*, 44: 197-203.
- Maria de los A., Nieves N., Sanchez M., Borroto C.G., Castillo R., Gonz'alez J.L., Escalona M., Baez E. & Hernandez Z. (1997) Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum sp.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51: 153-158.
- Martnez L.E., Aguero C.B., Lopez M.E. & Galmarini C.R. (2000) Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. *Plant Science*, 156: 221-226.
- McGranahan G.H., Leslie C.A., Uratsu S.L., Martin L.A. & Dandekar A.M. (1988) Agrobacterium-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 6: 800-804.
- Mederos-Molina S. (2008) Micropropagation of *Isoplexis chalcantha* Svent, O'Shanahan from Mature Plants. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 18: 131-137
- Mehrotra S., Goel M.K., Kukreja A.K. & Mishra B.N. (2007) Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*, 6: 1484-1492.
- Melchers G. & Labib G. (1974) Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts I. Selection of light resistant hybrids of "haploid" light sensitive varieties of tobacco. *Molecular Genral Genetics*, 135: 277-294.
- Melchers G., SaCristan M.D. & Holder A.A. (1978) Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Research Communication*, 43: 203-218.
- Mhatrea M., Salunkhe C.K., Rao P.S. (2000) Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. *Scientia Horticulturae*, 84: 357-363.
- Mimura T., Shindo C., Kato M., Yokota E., Sakano K., Ashihara H. & Shimmen T. (2000) Regulation of cytoplasmic pH under extreme acid conditions in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*: a possible role of inorganic phosphate. *Plant and Cell Physiology*, 41: 424-431.
- Mitra A., Dey S. & Sawarkar S.K. (1998) Photoautotrophic *in vitro* multiplication of the orchid *Dendrobium* under CO₂ enrichment. *Biologia Plantarum*, 41: 145-148.
- Miyawaki K., Matsumoto M. & Kakimoto T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyl transferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal*, 37: 128-138.
- Mohamed M.A-H (2005) In vitro selection of stress tolerant cell lines and plants of *Tazetes* spp. PhD. Dissertaion, Coventry University, Uk.

- Mohamed M.A-H, Alsadon A.A. & Al Mohaidib M.S. (2010a) Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 9:12-16.
- Mohamed M.A-H, Harris P.J.C. & Henderson J. (1999) An efficient *in vitro* regeneration protocol for *Tagetes minuta*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55: 211-215.
- Mohamed M.A-H. & Alsadon A.A. (2011) Effect of vessels type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annuum* L. 'cv. Analim'. *Biologia Plantarum*, 55: 370-374.
- Mohamed M.A-H. (2011) A protocol for the mass-micropropagation of *Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 86: 135-140.
- Mohamed M.A-H., Alsadon A.A. (2010b) Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. *Scientia Horticulturae*, 123:295-300.
- Mohamed M.A-H., Harris P.J.C. & Henderson J. (2000) *In vitro* selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. *Plant Science*, 159: 213-222.
- Mohan S.J. (1997) Micropropagation of selected somaclones of *Begonia* and *Saintpaulia*. *Journal of Biosciences*, 22: 585-592.
- Mondal T.K., Bhattacharya A., Laxmikumaran M. & Ahuja P.S. (2004) Review of Plant Biotechnology and Applied Genetics: Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 195-254.
- Monteuuisin O. (2004) *In vitro* Micropropagation and rooting of acacia mangium microshoots from Juvenile and mature origins. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 40: 102-107.
- Morel G. (1960) Producing virus-free *Cymbidium*. *American Orchid Society Bull.* 29, 495-497.
- Moshkov I.E., Novikova G.V. & Hall M.A. (2008) Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Absciscic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology*, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 227- 283.
- Moyer J.W. & Collins W.W. (1983) 'Scarlet' sweet potato. *HortScience*, 18: 111-112.
- Muhitch M.J., Edwards L.A. & Fletcher J.S. (1983) Influence of diamines and polyamines on the senescence of plant suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 2: 82-84.
- Muleo R., Morini S. & Casano S. (2001) Photoregulation of growth and branching of plum shoots: physiological action of two photosystems. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 37: 609-617.
- Muller A.J. & Grafe R. (1978) Isolation and characterization of cell lines of *Nicotianatabacum* lacking nitrate reductase. *Molecular General Genetic*, 161: 67-76.
- Munetaka S. (1999) Organogenesis *in vitro*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 61-64.

- Munksgaard D., Mattsson O. & Okkele F.T. (1995) Somatic embryo development in carrot is associated with an increase in levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and DNA methylation. *Physiologia Plantarum*, 93:5-10.
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Naik P.S. & Sarkar D. (2001) Sago: an alternative cheap gelling agent for potato *in vitro* culture. *Biologia Plantarum*, 44: 293-296.
- Nakano M., Niimi Y., Kobayashi D. & Watanabe A. (1999) Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous begonia (*Begonia x tuberhybrida* Voss). *Scientia Horticulturae*, 79: 245-251.
- Nakano M., Sakakibara T., Suzuki S. & Saito H. (2000) Decrease in the regeneration potential of long-term cell suspension cultures of *Lilium formosanum* Wallace and its restoration by the auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Plant Science*, 158: 129-137.
- Nandi S.K., Tamta S. & Palni L.M.S. (2002) Adventitious root formation in young shoots of *Cedrus deodara*. *Biologia Plantarum*, 45: 473-476.
- Nascimento L.C., Pio-Ribeiro G., Willadino L. & Andrade G.P. (2007) Stock indexing and potato virus y elimination from potato plants cultivated *in vitro*. *Scientia Agricola*, 60: 525-530.
- Neumann K-H., Kumar A. & Imani J. (2009) Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology Basics and Application. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Newell C., Growns D. & McComb J. (2006) Aeration is more important than shoot orientation when rooting lentil (*Lens culinaris* Medik.) cv. 'Digger' microcuttings *in vitro*. *In vitro Cellular and development Biology-Plant*, 42: 197-200.
- Nguyen Q.T. & Kozai T. (2005) Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: Kozai T., Afreen F. & Zobayed S.M.A. (Eds.) Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 123-146.
- Nhut D.T., Takamura T., Watanabe H., Okamoto K. & Tanaka M. (2003) Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 43-52.
- Nhut D.T., Van Le B., Fukai S., Tanaka M. & Tran K. (2001) Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. *Plant Growth Regulation*, 33: 59-65.
- Nikbakht A., Kafi M., Mirmasoumi M. & Babalar M. (2005) Micropropagation of Damask rose cvs Ghamsar and Azaran. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7: 535-538.
- Nissen S.J. & Sutter E.G. (1988) Stability of IAA and IBA in nutrient medium after autoclaving and after storage under various environmental conditions. *Hort Sciences*, 23: 758.
- Nitsch J.P. & Nitsch C. (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85-87.
- Nitsch J.P. (1951) Growth and development *in vitro* of excised ovaries. *American Journal of Botany*, 38: 566-577.

- Ochatt S.J. & Power J.B. (1992) Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: Moo-Young M., Warren G.S. & Fowler M.W. (Eds.), *Comprehensive Biotechnology* (2nd Suppl.) Pergamon Press, New York, USA. pp 99-127.
- Ogura-tsujita Y. & Okubo H. (2006) Effects of low nitrogen medium on endogenous changes in ethylene, auxins, and cytokinins in *in vitro* shoot formation from rhizomes of *Cymbidium kaman*. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 42: 614-616.
- Ohki S. & Sawaki S. (1999) The effects of inorganic salts and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and leaf chlorophyll content of *Delphinium cardinale*. *Scientia Horticulturae*, 81: 149-153.
- Orczyk W. & Malepszy S. (1985) *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L.V. Stabilizing effect of glycine on leaf protoplasts. *Plant Cell Reports*, 4: 269-273.
- Orlikowska T., Izabela S. A. & Kucharska D. (2000) The effect of leaf and shoot tip removal and explant orientation on axillary shoot proliferation of *Codiaeum variegatum* Blume var. *pictum* Muell. Arg. cv. Excellent. *Scientia Horticulturae*, 85: 103-111.
- Owens L.D. & Wozniak C.A. (1991) Measurement and effects of gel matrix potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultured sugarbeet leaf discs. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 26: 127-133.
- Paek K.Y., Chakrabarty D. & Hahn E.J. (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural & medicinal plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 81: 287-300.
- Palni L. (1984) Cytokinin Accumulation in the Culture Medium of *Vinca rosea* L. Crown-Gall Tissue: a Time-Course Study. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11: 129-136.
- Pan M.J. & Van Staden J. (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture—a review. *Plant Growth Regulation*, 26: 155-63.
- Panaia M., Senaratna T., Bunn E., Dixon K.W. & Sivasithamparam K. (2000) Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 63: 23-29.
- Papafotiou M., & Martini A.N. (2009) Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growth regulators on micropropagation of *Zamioculcas zamiifolia* Engl. (ZZ). *Scientia Horticulturae*, 120: 115-120.
- Parton R.M., Fischer R., Malho O., Papasoulitiotis, Jelitto T.C., Leonard T. & Read N.D. (1997) Pronounced cytoplasmic pH gradients are not required for tip growth in plant and fungal cells. *Journal of Cell Science*, 110: 1187-1198.
- Pasternak T., Miskolezi P., Ayaydin F., Mészáros T., Dudits D. & Fehér A. (2000) Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regulation*, 32: 129-141.
- Pasternak T.P., Prinska E., Ayaydin F., Miskolezi P., Potters G., Asard H., Van Onckelen H.A., Dudits D. & Fehér A. (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, 129: 1807-1819.

- Pechan P.M., Bartels D., Brown D.C.W. & Schell J. (1991) Messenger-RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* microspore embryogenesis. *Planta*, 184: 161-165.
- Pedraza-Santos ME, Lopez-Peralta MC, Gonzalez-Hernandez VA, Engleman-Clark EM, Sanchez-Garcia P (2006) *In vitro* regeneration of *Alstroemeria* cv. 'Yellow King' by direct organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84: 189-198.
- Perez-Parron M.A., Gonzalez-Benito M.E. & Perez C. (1994) Micropropagation of *Fragaria angustifolia* from mature and juvenile plant material. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37: 297-302.
- Perl A., Aviv D. & Galun E. (1988) Ethylene and *in vitro* culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene. *Plant Cell Reports*, 7: 403-406.
- Peschke V.M. & Phillips R.L. (1991) Activation of the maize transposable element *suppressor-mutator* (*Spm*) in tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 81: 90-97.
- Peschke V.M., Phillips R.L. & Gengenbach B.G. (1991) Genetic and molecular analysis of tissue culture-derived *Ac* elements. *Theoretical and Applied Genetics*, 82: 121-129.
- Petolino J.F., Cowen N.M., Thompson S.A., Mitchell J.C. (1990) Gamete Selection for Heat-Stress Tolerance in Maize. *Journal of Plant Physiology*, 136: 219-24.
- Phelan S., Douglas G. & Hunter A. (2006) Micropropagation and growth regulation of *Nolbaphia violacea* 'silver lace' ISHS Acta Horticulturae 764: XXVII International Horticultural Congress - IHC2006: International Symposium on Plant Biotechnology: From Bench to Commercialization.
- Phillips G.C. & Hubstenberger J.F. (1985) Organogenesis in pepper tissue cultures *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4: 261-269.
- Phillips J.L., Haggran W., Thomas J., Jones I.T. & Adey W.L. (1992) Magnetic field-induced changes in specific gene transcription. *Biochimistry Biophysical Acta*, 1132: 140-144.
- Phillips R.L., Kaeppler S.M. & Olhoft P. (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91: 5222- 5226.
- Piao X.C., Chakrabarty D., Hahn E.J. & Paek K.Y. (2003) A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. *Current Science*, 84:1129-1132.
- Piateczaka E., Wielanek E., Wysokinska H. (2005) Liquid culture system for shoot multiplication & secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaurea erythraea* Rafn. *Plant Science*, 168: 431-437.
- Pierik R.L.M. (1987) *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publisher, The Netherlands.
- Pious T., Sina K. & Gowda T.K.S (2007) Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures and host-endophyte interaction *in vitro* and *in vivo*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 380-390.

- Podwyszynska M. & Olszewski T. (1995) Influence of Gelling Agents on Shoot Multiplication and the Uptake of Macroelements by *In vitro* Culture of Rose, Cordyline and Homalomena. *Scientia Horticulturae*, 64: 77-84.
- Polsoni L., Kott L.S. & Beversdorf W.D. (1988) Large-scale microspore culture technique for mutation-selection studies in *Brassica napus*. *Canadian Journal of Botany*, 66: 1681-1685.
- Ponappa T., Brzozowski A.E. & Finer J.J. (1999) Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein. *Plant Cell Reports*, 19: 6-12.
- Pospisilová J., H. Synková D. Haisel & Semorádová (2007) Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: Effects of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid (a review). *Acta Horticulturae*, 748: 29-38.
- Pospisilova J., Ticha I., Kadlec P., Haisel D. & Plzakova S. (1999) Acclimatization of micropropagated plants to *ex-vitro* condition. *Biologia Plantarum*, 42: 481-497.
- Powell W. & Urrig H. (1987) Anther culture of *Solanum* genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 11: 13-24.
- Power J.B., Cummins S.E. & Cocking E.C. (1970) Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature*, 225: 1016-1018.
- Prakash S. (1993) Production of ginger and turmeric through tissue culture methods and investigations into making tissue culture propagation less expensive. Ph.D. Thesis. Bangalore Univ. Bangalore.
- Prakash S., Agrawal V. & Gupta S.C. (2003) Influence of some adjuvants on *in vitro* clonal propagation of male and female *Jojoba* plants. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 39: 217-222.
- Prakash S., Hoque M.I., Brinks T (2004) Culture media and containers. In: Low Cost Options for Tissue Culture Technology in Developing Countries, Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, held in Vienna, 26-30 August 2002, IAEA, Vienna, pp 29-40.
- Prameswara V.A., Johnston M, Perkins M., Robertson V. & Ratnadewi D. (2009) Ethylene influences development and flowering of *Psilopus* s pp *in vitro* and *ex vitro*. *Scientia Horticulturae*, 122: 227-232.
- Prathanturug S., Soonthornchareonnon N., Wongsatit C., Yuwalak P. & Promjit S. (2007) An improved protocol for micropropagation of *Mallotus repandus* (Willd.) Müll. Arg. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 43: 275-279.
- Predieri S. (2001) Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 185-210.
- Preece J. (2008) Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 403-422.
- Preece T.F. (1988) The natural history of plant pathogenic bacteria in and on plants. *Acta Horticulturae*, 225: 19-25.

- Prknov H (2007) The use of silica sand in micropropagation of woods. *Journal Forest Sciences*, 53: 88-92.
- Przetakiewicz Z.A., Orczyk W. & Nadolska-Orczyk A. (2003) The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 245-256.
- Puigderrajols P., Celestino C., Suils M., Toribio M. & Molinas M. (2000) Histology of organogenic and embryogenic responses in cotyledons of somatic embryos of *Quercus suber* L. *International Journal of Plant Sciences*, 161:353-362.
- Purohit S.D. & Singhvi A. (1998) Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. *Scientia Horticulturae*, 76: 219-229.
- Puschmann R., Ke D. & Romani R. (1985) Ethylene production by suspension-cultured pear fruit cells as related to their senescence. *Plant Physiology*, 79: 973-976.
- Puthur J.S., Prasad K.V.S.K., Sharmila P. & Pardha Saradhi P. (1998) Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi improves establishment of micropropagated *Leucaena leucocephala* plantlets. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 53: 41-47.
- Quraishi A., Koche V., Sharma P. & Mishra S.K. (2004) *In vitro* Clonal Propagation of Neem (*Azadirachta indica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78: 281-284.
- Răuciu M., Creangă D. & Horga I. (2008) Plant growth under static magnetic field influence. *Roman Journal of Physical*, 53: 353-359.
- Rai M.K. (2001) Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 37: 158-167.
- Rains D.W., Valentine R.C. & Hollaender A. (1980) *Genetic Engineering of Osmoregulation*. Plenum Press, New York, London, UK.
- Rakoczy-Trojanowska M. (2002) Alternative methods of plant transformation — A short review. *Cellular Molecular Biology Letters*, 7: 849-858.
- Rakosy-Tian L., Aurori C.M. & Morariu V.V. (2005) Influence of near null magnetic field on *in vitro* growth of potato and wild *Solanum* species. *Bioelectromagnetics*, 26: 548-557.
- Ramage C.M. & Williams R.R. (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 38: 116-124.
- Ramming D.W. (1990) The use of embryo culture in fruit breeding. *HortSciences*, 25: 393-398.
- Rao A.Q., Bakhsh A., Kiani S., Shahzad K., Shahid A.A., Husnain T. & S. Riazuddin (2009) The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*, 27: 753-76.
- Rao N.K. (2004) Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3:136-145.
- Rathore J.S., Rathore M.S., Singh M., Singh R.P. & Shekhawat N.S. (2007) Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. *Indian Journal of Biotechnology*, 6: 239-244.
- Rathore J.S., Vinod Rathore N.S., Shekhawat R.P. Singh G. L., Phulwaria M. & Dagla H.R. (2005) Micropropagation of Woody Plants. In: Srivastava P.S., Narula A. & Srivastava S. (Eds.) *Plant Biotechnology and Molecular Markers* Anamaya Publishers, New Delhi, India. pp 195-205.
- Razdan M.K. (2002) *Introduction to Plant Tissue Culture*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, India.

- Read P.E. (1988) Stock plants influence micropropagation success. *Acta Horticulturae* 226:41-52.
- Redenbaugh K., Nichol J., Kossler M.E. & Paasch B. (1984) Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. *In vitro*, 20: 256-257.
- Reed S.M. (2005) Haploid Cultures. In: Trigiano R.N. & Gray D.J. (Eds.) *Plant Development And Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton London New York Washington, D.C. pp 225- 234.
- Reidiboy-m-talleux L., Diemer F., Sourdioux M., Chapelain K. & De-march G.G. (1999) Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*), effect of maltose and ABA supplements. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 55: 199-209.
- Revilla A.M., Pacheco J., Casares A. & Rodriguez R. (1996a) *In vitro* reinvigoration of mature Olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 32: 257-261.
- Revilla M.A., Pacheco J., Casares A., Rodriguez R. (1996b) Induced rejuvenation of mature olive trees cvArbequina. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 32: 257-261.
- Rey M., Diaz-Sala C. & Rodriguez R. (1994) Polyamines as markers for juvenility in filbert. *Acta Horticulturae* 351: 233-237.
- Riek J.D., Piqueras A. & Debergh P.C. (1997) Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 269-278.
- Robert M.L., Flores M.R. & Loyola-Vargas V.M. (1989) Growth promoting activity of certain penicillins on cultured cells of *Bouvardia ternifolia*. *Phytochemistry*, 28: 2659-2662.
- Roberts D.R., Walker M.A., Thompson J.E. & Dumbroff E.B. (1984) The effects of inhibitors of polyamine and ethylene biosynthesis on senescence, ethylene production and polyamine levels in cut carnation flowers. *Plant and Cell Physiology*, 25: 315-322.
- Robinson K.E.P. & Adams D.O. (1987) The role of ethylene in the regeneration of *Helianthus annuus* (sunflower) plants from callus. *Physiologia Plantarum*, 71: 151-156.
- Roche T.D. & Cassells A.C. (1996) Gaseous and media-related factors influencing *in vitro* morphogenesis of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) 'Nahodka' node cultures. *Acta Horticulturae*, 440: 588-593.
- Rodrigues P.H.V., Tullmann A.N., Cassieri N.P. & Mendes B.M.J. (1998) Influence of the number of subcultures on somaclonal variation in micropropagated Nanico (*Musa* spp. AAA group). *Acta Horticulturae* 490:469-473.
- Roest S. & Bokelmann G.S. (1975) Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 3: 317-330.
- Rout G.R., Mohapatra A. & Jain M.S. (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24: 531-560.
- Rout G.R., Samantaray S. & Das P. (2000) *In vitro* somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae*, 86: 71-79.

- Rout G.R., Samoantaray S., Mottley J. & Das P. (1999) Biotechnology of the rose: a review of recent progress. *Scientia Horticulturae*, 81: 207-28.
- Rustaei M., Nazehi S., Ghadimzadeh M. & Hemmati S. (2009) Effect of phloroglucinol, medium type and some component on *in vitro* proliferation of dwarf rootstock of apple (*Malus domestica*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 11: www.fspublishers.org/ijab/past-issues/IJABVOL_11_NO.../15.pdf
- Ružić D., Sarić M., Čerović R. & Čulafić L. (2000) Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 9-14.
- Ruzic R., Jerman L., Jeglic A. & Fefer D. (1993) Various effects of pulsed and static magnetic fields on the development of *Cestronia sativa* Mill. in tissue culture. *Electro Magnetobiol.*, 12: 165-177.
- Safarnejad A. (2004) Characterization of Somaclones of *Medicago sativa* L. for Drought Tolerance. *Journal of Agricultural Sciences and Technology*, 6: 121-127.
- Sahijram L., Soneji J.R. & Bollamma K.T. (2003) Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp). *In vitro Cellular and Development Biology - Plant* 39: 551-556.
- Sami R. & Jarwal P.K. (2002) Age, position in mother seedling, orientation, and polarity of the epicotyl segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response. *Plant Science*, 163: 101-109.
- Sakakibara H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Physiology*, 57: 431-449.
- Salajova T., Salaj J. & Kormutak A. (1999) Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. *Plant Science*, 145: 33-40.
- Sallanon H., Laffray D. & Coudret A. (1991) Ultrastructure and functioning of guard cells of *in vitro* cultured rose plants. *Plant physiology & biochemistry*, 29: 333-339.
- Salm M.T.P.M., Toorn C.J.G., Hänisch T.C.H., Dubois L.A.M., De Vries D.P. & Donsh J.M. (1994) Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. Moneyway. *Plant cell, tissue and organ Culture*, 37: 73-77.
- Sanavy A.M. & Moeini J.M. (2003) Effects of different pH levels of medium on growth and rooting of single nodes resulted from potato meristem culture. *Plant Tissue Culture*, 13: 151-154.
- Santamaria J.M., Murphy K.P., Leifert C. & Lumsden P.J. (2000) Ventilation of culture vessels. II. Increased water movement rather than reduced concentrations of ethylene and CO₂ is responsible for improved growth and development of *Delphinium in vitro*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnolog.* 75: 320-327.
- Sarma K.S., Maesato K., Hara T. & Sonoda Y. (1990) Effect of method of agar addition on post-autoclave pH of the tissue culture media. *Annals of Botany*, 65: 37-40.
- Saxena C., Samantaray S., Rout G.R. & Das P. (2000) Effect of auxins on *in vitro* rooting of *Plumbago zeylanica*: peroxidase activity as a marker for root induction. *Biologia Plantarum*, 43: 121-124.

- Schenk R.U. & Hildebrandt A.C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50: 199-204.
- Schneider F. (2005) Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa sp.* L.) and globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). Ph D dissertation, Technische Universitt München.
- Scholten H.J. & Pierik R.L.M. (1998) Agar as a gelling agent: different biological effects *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 77: 109-116.
- Scholten H.J. (1998) Effect of polyamines on the growth and development of some horticultural crops in micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 77: 83-88.
- Schuller A. & Reuther G. (1993) Response of *Abies alba* embryonal-suspensor mass to various carbohydrate treatments. *Plant Cell Repots*, 12: 199-202.
- Schwambach J., Fadanelli C. & Fett-Neto A.G. (2005) Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol.*, 25: 487-494.
- Scott K.J., Chin J.C. & Wood C.J. (1978) Isolation and culture of cereal protoplasts. In: Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Science Press, Peking, China. pp 293-315.
- Seabrook J.E.A. (2005) Light Effects on the Growth & Morphogenesis of Potato (*Solanum tuberosum*) *In vitro*: A Review. *American Journal of Potato Researsh*, 82: 353-367.
- Sedlak J., Paprstein F. & Erbenova M. (2008) *In vitro* Propagation of the P-HL Dwarfing Sweet Cherry Rootstocks Proc. 5th on Cherry. *Acta Horticulturae*, 795: 395-399.
- Semal J. & Lepoivre P. (1990) Application of tissue culture variability to crop improvement. In: S.S. Bhojwani (Ed.), Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp 301-315.
- Semorádová Š., Synková H. & Pospíšilová J. (2002) Responses of tobacco plantlets to change of irradiance during transfer from *in vitro* to *ex vitro* conditions. *Photosynthetica*, 40:605-614.
- Senda M., Takeda J., Abe S. & Nakamura T. (1979) Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. *Plant Cell Physiology*, 20: 1441-1443.
- Serret M.D. & Trillas M.I. (2000) Effects of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultured *in vitro*. *International Journal of Plant Science*, 161: 281-289.
- Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U. & Wilhelm E. (2002) Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces*-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbial Ecology*, 39: 23-32.
- Shaik S., Dewir Y.H., Singh N., Nicholas A. (2009) Micropropagation and bioreactor studies of the medicinally important plant *Lessertia* (*Sutherlandia*) *frutescens* L. *South African Journal of Botany*, 76: 180-186..
- Sharifian S., Vahdati K., Mirmasoumi M. & Ghaem Maghami S.A. (2009) Assessment of Phloroglucinol effect on rooting of tissue cultured *Persian* walnut. *Acta Horticulturae*, 812: 189-196.

- Shatnawi M.A., Shibli R.A. & Migdadi (2006) Influence of different carbon sources on wild pear (*Pyrus syriaca*) growth and sugar uptake. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2: 156-161.
- Sha-valli Khan P.S., Hausman J.F. & Rao K.R. (1999) Effect of agar, MS medium strength, sucrose and polyamines on *in vitro* rooting of *Syzygium alternifolium*. *Biologia Plantarum*, 42: 333-340.
- Shields R., Robinson S.J. & Anslow P.A. (1984) Use of fungicides in plant tissue culture *Plant Cell Reports*, 3: 33-36
- Shoeb F., Yadav J.S., Bajaj S. & Rajam M.V. (2001) Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of *indica* rice. *Plant Science*, 160: 1229-1235.
- Singh P., Roy B.K. & Rai S. (1996) Morphological and cytogenetic effect of 50 Hz EM-field-induced nutrient solution on *Vicia faba* L. *Electro-Magnetobiol*, 15: 109-118.
- Singh S.K. & Shyamal M.M. (2000) Effect of media and physical factors on *in vitro* rooting in roses. *Horticultural Journal*, 14: 91-97.
- Singh S.K., Rai M.K., Asthana P. & Sahoo L. (2009) An improved micropropagation of *Spilanthes acmella* L. through transverse thin cell layer culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31: 693-698.
- Skirvin R.M. & Janick J. (1976) Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* s pp. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101: 281-290.
- Skirvin R.M., Chu M.C., Mann M.L., Young H., Sullivan J. & Fermanian T. (1986) Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, 5: 292-294.
- Smith M.A., Davies P.J. & Reid J.B. (1985) Role of polyamines in gibberellin-induced internode growth in peas. *Plant Physiology*, 78: 92-99.
- Smith M.A.L., Palta J.P. & Mccown B.H. (1986) Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedlings and greenhouse-grown Asian white birch. *Journal of the American Society for Horticultural Scienc*, 111: 437-442.
- Soh W.Y., Choi P.S. & Cho D.Y. (1998) Effects of cytokinin on adventitious root formation in callus cultures of *Vigna unguiculata* (L.) walp. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 34: 189-195.
- Spiegel-Roy P. & Saad S. (1986) Effect of carbohydrates and inhibitors of GA3 biosynthesis on embryogenic potential of salt tolerant and non-tolerant callus lines of orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Science*, 47: 215-220.
- Stafford A. & Warren G. (1991) *Plant Cell and Tissue Culture*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Stange B.C., Rowland R.E., Rapley B.I. & Podd J.V. (2002) ELF magnetic fields increase amino acid uptake into *Vicia faba* L. roots and alter ion movement across the plasma membrane. *Bioelectromagnetics*, 23: 347-354.
- Stasolla C., van Zyl L., Egertsdotter U., Craig D., Liu W. & Sederoff R.R. (2003) The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology*, 131: 49-60.

- Steffens G.L., Wang S.Y., Faust M. & Byun J.K. (1985) Controlling plant growth via the gibberellin biosynthesis system. I. Growth parameter alterations in apple seedlings. *Physiolga Plantarum*, 63: 163-168.
- Steinitz B. (1999) Sugar alcohols display nonosmotic roles in regulating morphogenesis and metabolism in plants that do not produce polyols as primary photosynthetic products. *Journal of Plant Physiology*, 155: 1-8.
- Stirk W.A., Strnad M., Novak O. & Van Staden J. (2003) Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regulation*, 41: 13-24.
- Suda N., Iwai H., Satoh H., Sakai S. (2009) Benzyladenine arrests cell cycle progression in G1 phase in tobacco BY-2 cells preceding induction of cell death. *Plant Biotechnology*, 26, 225-235.
- Suezawa K., Matsuta N. Omura M. & Yamaki S. (1988) Plantlet formation from cell suspensions of kiwi fruit (*Actinidia chinensis* Planch. var. *chinensis*). *Scientia Horticulturae*, 37: 123-128.
- Taber R.P., Zhang C. & Hu W.S. (1998) Kinetics of Douglas- fir (*Pseudotsugamenziesii*) somatic embryo development. *Canadian Journal of Botany*, 76: 863-871.
- Tadino V.L.A., Faez J.M., Christiaens L.E., Kevers C., Gaspar T. & Dommes J. (2003) Synthesis and activity of another seleniated auxin: 2,4-dichlorophenylselenoacetic acid. *Plant Growth Regulation*, 40: 197-200.
- Takebe I., Labib G. & Melchers G. (1971) Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, 58: 318-320.
- Tang W. & Fan Q.Y. (1999) Plant regeneration via organogenesis from six families of loblolly pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58: 223-226.
- Tang W. & Newton R.J. (2004) Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science*, 167: 621-628.
- Tanimoto S., Miyazaki A. & Harada H. (1985) Regulation by abscisic acid of *in vitro* flower formation in *Torenia* stem segments. *Plant Cell Physiology*, 26: 675-682.
- Tao W. & Verbelen J. (1996) Switching on and off cell division and cell expansion in cultured mesophyll protoplasts of tobacco. *Plant Science*, 116: 107-115.
- Tartoura K., Da Rocha A. & Youssef S. (2004) Synergistic interaction between coumarin 1,2-benzopyrone and indole-3 butyric acid in stimulating adventitious root formation in *Vigna radiata* (L) Wilczek cuttings. I. Endogenous free and conjugated IAA and basic peroxidases. *Plant Growth Regulation*, 42: 253-262.
- Teasdale R.D. (1987) Micronutrients. In: Bonga J.M. & Durzan D.E. (Eds.) *Cell and Tissue Culture in Forestry Vol 1. General Principles and Biotechnology*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. pp 17-49
- Te-chato S. & Lim M. (2000) Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from *in vitro*-derived leaf explants. *Scientia Horticulturae*, 86: 291-8.
- Terzi M. & Lo Schiavo F. (1990) Developmental mutants in carrot. In: Nijkamp H.I.J., Van Der Plas I.H.W. & Van Aartrijk J. (Eds.) *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Proc. VIIth Int. Cong. on Plant Tissue and Cell Culture*.

- Tyagi R.K. & Prakash S. (2004) Genotype and sex-specific protocols for *in vitro* micropropagation and medium-term conservation of jojoba. *Biologia Plantarum*, 48: 19-23.
- Tyburski J. & Tretyn A. (2004) The role of light and polar auxin transport in root regeneration from hypocotyls of tomato seedling cuttings. *Plant Growth Regulation*, 42: 39-48.
- Tynan J.L., Conner A.J., Macknight R.C. & Poulter R.T.M. (1994) Miconazole: An effective antifungal agent for plant tissue culture *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32: 293-301.
- Vahdati K., Najafian Ashrafi E., Ebrahimzadeh H. & Mirmasoumi M. (2008) Improved micropropagation of *Walnut* (L.) on media optimized for growth based upon mineral content of walnut seed. *ISHS Acta Horticulturae*, 839: 117-124.
- Valdés A.E., Belén Fernández B & Luz M. (2003) Alterations in endogenous levels of cytokinins following grafting of *Pinus radiata* support ratio of cytokinins as an index of ageing and vigour. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1407-1410.
- Valdés A.E., Ordás R.J., Fernández B. & Centeno M.L. (2001) Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. *Plant Physiol Biochem*, 39: 377-384.
- Valero M., Ibañez A. & Morte A. (2003) Effects of high vineyard temperatures on the grapevine leafroll associated virus elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures. *Scientia Horticulturae*, 97: 289-296.
- Valledor I., Hasbunr., Rodriguez J.M., Viejo S.F., Berdasco M., Feito I., Fraga M.F., Jesus M., Rodriguez R. (2007) Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91: 75-86.
- Van der Krieken W.M., Breteler H. & Visser M.H.M. (1992) Uptake and metabolism of indolebutyric acid during root formation on *Malus* microcuttings. *Acta Bot. Neerl.*, 41: 435-442.
- Van Huylenbroeck J.M., Huygens H. & Debergh P.C. (1995) Photoinhibition during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* "Petite" plantlets. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 31: 160-164.
- Van Huylenbroeck J.M., Piqueras A. & Debergh P.C. (1998) Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Science*, 134: 21-30.
- Van Huylenbroeck J.M., Piqueras A. & Debergh P.C. (2000) The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant Science*, 155: 59-66.
- Van Staden J. & Drewes F.E. (1992) The stability and metabolism of benzyladenine glucosides in soybean callus. *Journal of Plant Physiology*, 140: 92-95.
- Van Staden J., Zazimalova E. & George E.F. (2008) Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology*, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 205-226.
- Vasil I.K. (2008) A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 27: 1423-1440.

- Veilleux R.E. & Johnson A.T. (1998) Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization. *Plant Breeding Review*, 16: 229-268.
- Veilleux R.E., Compton M.E. & Saunders J.A. (2005) Use of Protoplasts for Plant Improvement. In: Trigiano R.N. & Gray D.J. (Eds.) *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton London New York Washington, D.C. USA. pp. 213-224.
- Vengadesan G., Ganapath A., Amuth S. & Selvaraj N. (2003) High-frequency plant regeneration from cotyledon callus of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. *In vitro Cellular and development Biology-Plant*, 39: 28-33.
- Vengadesan G., Ganapathi A., Anand R.P. & Anbazhagan V.R. (2000) *In vitro* organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61: 23-28.
- Vengadesan G., Ganapathi A., Anand R.P. & Anbazhagan V.R. (2000) *In vitro* organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 61: 23-28.
- Von Arnold S. (1987) Effect of sucrose on starch accumulation in, and adventitious bud formation on, embryos of *Picea abies*. *Annals of Botany*, 59: 15-22.
- Von Arnold S. (2008) Somatic Embryogenesis In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G.J. (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology*, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 335-254.
- Voylatzi C. & Voyiatzi D.G. (1988) Shoot proliferation of the rose cv. (H.T.) Dr. Verhage as influenced by apical dominance regulating substances. *Acta Horticulturae*, 226: 671-674.
- Wakasa K. (1979) Variation in the plants differentiated from the tissue culture of pineapple. *Japanese journal of breeding*, 29: 13-22.
- Walden R. & Wingender R. (1995) Gene-transfer and plant-regeneration techniques. *Trends Biotechnology*, 13: 324-331.
- Wan Y., Sorensen E.L. & Liang G.H. (1988) Genetic control of *in vitro* regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Euphytica*, 39: 3-9.
- Wang S. & Steffens G. L. (1987) Effect of paclobutrazol on water stress induced abscisic acid in apple seedlings leaves. *Plant Physiology*, 84: 1051-1054.
- Wardle K., Dobbs E.B. & Short K.C. (1983) *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *American Society for Horticultural Science*, 108: 386-38.
- Warzecha H. & Hennig A. (2010) Plastid Transformation In: In: Genetic modification of plants - agriculture, horticulture & forestry. Kempken F. & Jung C. (Eds). 64: 23-37.
- Watt P.M., Berjak P., Makhathini A. & Blakeway F. (2003) *In vitro* field collection techniques for Eucalyptus micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75: 233-240.
- Weide R., Koornneef M., & Zabel P. (1989) A simple, nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. *Theoretical Applied Genetics*, 78: 169-172

- Welander M. & Negash L. (2005) Micropropagation of *Hagenia abyssinica*: a multipurpose tree *Tileye Feyissa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80: 119-127.
- Wenzel G., Hoffmann F., Potrykus I. & Thomas E. (1975) The separation of viable rye microspores from mixed populations and their development in culture. *Molecular General Genetic*, 138: 293-297.
- West T.P. & Preece J. (2006) Use of acephate, benomyl and alginate encapsulation for eliminating culture mites and fungal contamination from *in vitro* cultures of hardy Hibiscus (*Hibiscus moscheutos* L.) *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 42: 301-304.
- Wetzstein H.Y. & Sommer H.E. (1982) Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *American Journal of Botany*, 69: 1579-1586.
- Williams E. & De Lautour G. (1980) The use of embryo culture with transplanted nurse endosperm for the production of interspecific hybrids in pasture legumes. *Botanical Gazette*, 141: 252-257.
- Williams R.R. (1993) Mineral nutrition *in vitro* - A mechanistic approach. *Aust. J. Bot.* 41: 237-251.
- Willyams D., Whiteman P., Cameron J. & Chandler S. F. (1992) Inter- and intra-family variation in rooting capacity in micropropagated *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. In: Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species (AFOCEL-IUFRO Symposium). II: 177-181. Association Forêt Cellulose, Nangis, France.
- Wilson D.P.M., Sullivan J.A., Marsolais A.A, Tsujita M.J. & Senaratna T. (1996) Improvement of somatic embryogenesis in zonal geranium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 27-32.
- Withers L.A. (1986) *Plant Tissue Culture and its Agricultural Application*. Butterworths, London, UK.
- Witte C.P., Tiller S.A., Taylor M.A. & Davies H.V. (2002) Addition of nickel to Murashige and Skoog medium inplant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 103-104.
- Wojtania A., Pulawska J. & Gabryszewska E. (2005) Identification and elimination of bacterial contaminants from *Pelargonium* tissue cultures. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 13: 101-108.
- Woodward A.J., Bennett I.J. & Pusswonge S. (2006) The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on *in vitro* shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata*. *Scientia Horticulturae*, 110: 208-213
- Woodward A.W. & Bartel B. (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95: 707-735.
- Woodward A.W. (2005) A Receptor for Auxin. *The Plant Cell*, 17: 2425-2429.
- Wright N.A. (1980) The growth of tulip tissues *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 109: 263-270.
- Wu L., Nandi S., Chen L., Rodriguez R.L. & Huang N. (2002) Expression and inheritance of nine transgenes in rice. *Transgenic Research*, 11: 533-541.

- Wu X., Zhang F.G., Liu C. & Zhang X. (2009) Differential gene expression of cotton cultivar CCR124 during somatic embryogenesis. *Journal of Plant Physiology*, 166: 1275-1283.
- Yang S-H. & Yeh D-M. (2008) *In vitro* leaf anatomy, ex vitro photosynthetic behaviors and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semi-solid medium and temporary immersion systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93: 201-207.
- Yano-Melo A.M., Saggin O.J., Lima-Filho J.M., Melo N.F. & Maia L.C. (1999) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. *Mycorrhiza*, 9: 119-123.
- Yoon Y.J., Mohin M., Hahn E.J. & Pae K.Y. (2009) Impact of *in vitro* CO₂ enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to *ex vitro* conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 65: 183-188.
- Yu T.-A., Yeh S.-D. & Yang, J.-S. (2003) Comparison of effects of kanamycin and geneticin on regeneration of papaya from root tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 169-178.
- Zambre M., Goossens A., Cardona C., Van Montagu M., Terryn N. & Angenon G (2005) An efficient and reproducible *Agrobacterium* mediated transformation systems for cultivated *Phaseolus acutifolius* (tepary bean). *Theoretical and Applied Genetics*, 110: 914-924.
- Zamski E. & Wyse R.E. (1985) Stereospecificity of glucose carrier in sugar beet suspension cells. *Plant Physiology*, 78: 291-295.
- Zawadzka M. & Orlikowska T.K. (2006) The influence of FeEDDHA on red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious regeneration from explants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 85: 145-149.
- Zeng L., Xu H., Zeng Y., Luan A. & Wang H. (2009) High efficiency *in vitro* plant regeneration from epicotyl explants of Ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 45: 559-564.
- Zenkter M. (1970) Test-tube fertilization of ovules in *Melandrium album* Mill. With pollen grains of *Datura stramonium* L. *Experientia*, 26: 661-662.
- Zhang C.L., Chen D.F., Elliott M.C. & Slater A. (2004) Efficient procedures for callus induction and adventitious shoot organogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 40: 475-481.
- Zhang J-E., Guo W-W. & Deng X.X. (2006) Relationship between ploidy variation of citrus calli and competence for somatic embryogenesis. *Acta Genetica Sinica*, 33: 647-654.
- Ziv M (1999) Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. *Horticultural Reviews*, 24: 1-30.
- Ziv M. (1991) Quality of micropropagated plants - vitrification. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 27: 64-69.
- Zobayed S. (2005) Ventilation in micropropagation In: T. Kozai, F. Afreen & Zobayed S.M.A. (Eds.) Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a new micropropagation and transplant production system, Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 147-186.

- Zobayed S.M.A., Afreen F. & Kozai T. (2001) Physiology of *Eucalyptus* plantlets cultured photoautotrophically under forced ventilation. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 37: 807-813.
- Zupan J., Muth T.R., Draper O. & Zambryski P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. *Plant Journal*, 23: 11-28.

معجم المصطلحات

Abscisic acid (ABA)

حامض الأبسيسيك: هرمون نباتي له دوراً في الشيخوخة والسكون والإجهاد البيئي.

Agar

الاجار: منتج يصنع من الطحالب البحرية وهو حامل كيميائي يستخدم لإعطاء البيئة قوام شبه صلب.

Antibiotic

المضاد الحيوي: هو مانع لنمو الكائنات الدقيقة

Adventitious

العرضي: يطلق على العضو النباتي كالقلم الميرستيمية، الجذور، السيقان أنها عرضية إذا تكونت في مكان غير مكانها الطبيعي مثل تكوين البراعم على الأوراق أو الكالس. أو تكوين الجنين في أي مكان غير الزيجوت.

Amphidiploid

الفرد شبيهة الثنائي: النوع المتكون من مضاعفة العدد الكروموسومي للجيل الأول الناتج من تهجين نوعين نباتيين مختلفين.

Androgenesis

تكشف النباتات من الجاميطات المذكرة.

Aneuploidy

التضاعف عددي غير تام للكروموسومات: تحدث هذه الحالة عندما لا تحتوي النواة على عدد من الكروموسومات بالمضاعفة التامة للعدد الفردي، حيث يوجد زوج أو أكثر من الكروموسومات بعدد أكبر أو أقل من الكروموسومات الأخرى.

Anther culture

مزارع المتك: فصل وزراعة المتك (الجزء الطرفي من عضو التذكير في الزهرة والذي يحتوي على كيس حبوب اللقاح) للحصول على نباتات أحادية.

Aseptic

مُعقم: خلو البيئة أو المُستأصل النباتي من الكائنات الدقيقة، والبكتيريا، والفطر، والخميرة، والفيروس، والميكوبلازما.

Apical dominance

ظاهرة السيادة القمية: وهي تثبيط نمو البراعم الجانبية بسبب وجود البرعم الطرفي.

Apical meristem

الميرستيم الطرفي: الميرستيم الموجود على قمة الساق الرئيسي أو الأفرع الجانبية.

Asexual propagation

التكاثر اللاجنسي: إكثار النبات باستخدام أي جزء غير الجنين الناتج من التلقيح والإخصاب.

Autotrophic

ذاتى التغذية: إذا كان النبات أو الجزء المنزرع منه لا يحتاج إلى إضافة مادة محددة لازمة للنمو إلى بيئة النمو حيث يمكن للنبات أو العضو المنزرع تخليق هذا المركب من المواد غير العضوية.

Auxin

الأوكسين: هرمون نباتى يعتبر مشجع لاستطالة الخلايا وتكوين الجذور وغيرها من العمليات الحيوية، منه ما هو طبيعى IAA ومنه ما هو مصنع مثل 2,4-D.

Auxotroph

غير ذاتى التغذية: إذا كان النبات أو الجزء المنزرع منه يحتاج إلى إضافة مادة محددة لازمة للنمو إلى بيئة النمو حيث لا يمكن للكائن أو العضو تخليق هذا المركب من المواد غير العضوية.

Axillary buds

البراعم الجانبية: هى تلك البراعم المتكونة فى الزاوية المحصورة بين الساق والورقة.

Axenic culture

المزرعة المعقمة: المزرعة التى لا تحتوى على أي صورة من صور الحياة غير المرغوبة، بمعنى خالية من التلوث. لكن فى بعض الحالات يتم عمداً تحضين الأنسجة النباتية مع بعض الكائنات الدقيقة لأغراض مختلفة كالتحول الوراثي.

Bioreactor

المفاعل الحيوى: وهو وعاء يستعمل فى العمليات البيولوجية لتنمية الكائنات الدقيقة، والخلايا النباتية، والأشطاء أو الأجنة الجسدية بغرض الإكثار أو الحصول على بغرض المركبات الفعالة.

Biosynthesis

التخليق الحيوى: استغلال الخلايا الحية أو الكائنات الدقيقة فى تخليق بعض المركبات الكيميائية.

Biotechnology

التقنية الحيوية: استخدام بعض التقنيات لتحويل العمليات الأساسية فى النمو والتوالد للنبات أو الحيوان، أو الكائنات الدقيقة بهدف تشجيع إنتاج بعض المركبات أو إنتاج مركبات جديدة.

Callus (Plural: calluses/ calli)

الكالس: يطلق لفظ الكالس على كتلة من الخلايا نشطة الانقسام غير متميزة النمو تتكون عند جرح النسيج النباتى أو فى زراعة الأنسجة.

Cell culture

زراعة الخلايا: زراعة الخلايا الفردية أو مجموعات صغيرة من الخلايا المتشابهة.

Chimera

الكيميرا: عبارة عن نبات أو نسيج يحتوى على مجموعتين أو طبقتين من الخلايا مختلفتين وراثياً.

Chromosome

الكروموسوم: جسم خيطي الشكل غالباً ويتكون من المادة الوراثية DNA والبروتينات الهستونية وغير الهستونية

Clone

المستنعمرة: مجموعة من الخلايا أو الأنسجة التي تكاثرت بانقسام خلية واحدة، تطلق أيضاً على النباتات التي تكوّنت من بنات واحد بالإكثار الخضري.

Contaminants

التلوث: فى هذا النسق يشير إلى نمو الكائنات الحية الدقيقة التي ربما تثبط نمو الخلايا أو الأنسجة النباتية.

Cybrid (Cytoplasmic hybrid)

الهجين الجسدى أو السيتوبلازمى: هو الهجين الذي يتم فيه استبعاد نواة أحد الأبوين أما السيتوبلازم فهو من الأبوين أو من أحد الآباء.

Cytokinin

السيتوكينينات: هي هرمونات نباتية عبارة عن مشتقات الأدينين مثل Zeatin و BA أم مشتقات اليوريا مثل TDZ وهي تشجع الانقسام الخلوى، والتكثف، ولها دور في كسر السيادة التّمية.

Cytoplasmic hybrid

الهجين السيتوبلازمى: أنظر Cybrid

Deionized water

الماء المتأين: هو الماء الخالى من المركبات غير العضوية.

Detergent

المواد المطهرة: المواد المطهرة التي تعمل على خفض التوتر السطحي للمحلول وتضاف أثناء التعقيم السطحي للأجزاء النباتية لتزيد من التصاق المحلول المعقم بالسطح النباتى.

Dedifferentiation

الارتداد إلى عدم التكشف: ارتداد العضو المتميز إلى حالة عدم التميز

Differentiated cell

الخلايا المتكشفة: تكون الخلايا متكشفة لو أظهرت صفات مختلفة عن الخلايا الميرستيمية بمعنى أن تصبح الخلية ذات صفات مورفولوجية أو تشريحية محددة. وحالة التكشف غالباً ثابتة. لكن يستخدم هذا المصطلح فى زراعة الأنسجة ليعنى تكون ساق أو جذر أو جنين من خلايا أو كالس.

Differentiation

التكشف: تحول الخلية الميرستيمية إلى خلية متخصصة فسيولوجياً أو تشريحياً.

Deionize

Disease-free

إزالة الأيونات الموجودة بالماء

نبات خالى من الأمراض: شهادة للنبات من خلال بعض الاختبارات أنه خالى من

Diploid

أمراض محددة.

ثنائى نُسَخ الأليلات : وجود نسختين من كل كرموسوم مميز للنوع.

Disinfection

التطهير من الجراثيم: قتل الكائنات الدقيقة، ويستخدم كمرادف لتعقيم الأجزاء النباتية.

Distilled water

الماء المقطر: هو الماء الخالى من مركبات عضوية أو غير عضوية.

Electroporation

التثقيب الكهربائى: يتم باستخدام فرق الجهد الكهربائى لتكوين ثقب مؤقتة فى الغشاء الخلوي تسمح بدخول بعض المواد كالحامض النووي أو الجينات إلى السيتوبلازم

Embryo culture

زراعة الأجنة: زراعة الجنين الناضج أو غير الناضج فى بيئة مغذية.

Embryoid (somatic embryo)

الجنين الجسدي: نشو الجنين اللازيجوتي في مزارع الأنسجة من خلايا جسدية.

Embryogenesis

تكوين الجنين: عملية تكوين الجنين سواء من اتحاد خلايا جنسية أو من خلايا جسدية.

Endomitosis

التضاعف الميتوزى: تضاعف العدد الكروموسومى بسبب انقسام النواة دون انقسام السيتوبلازم.

Endopolyploidy

التضاعف الداخلى: إنتاج أفراد متضاعفة بسبب حدوث تضاعف العدد الكروموسومى للخلية دون انقسامها.

Epigenetic variations

التغيرات غير الموروثة: تلك التغيرات غير الموروثة التى لا تعكس تغيير فى الحامض النووى والتى تنعكس بعد فترة وترتد إلى حالتها الأصلية غالباً، وربما ترجع لتغيير فى تعبير الجين.

Endosperm

الإندوسبرم: الطبقة المغذية أو السائل المحيط بالجنين في البذرة.

Explant

المُستأصل النباتي: هو ذلك الجزء من النبات الذي يتم فصله وزراعته لبدء تكوين المزرعة في زراعة الأنسجة.

Feeder layer (Nurse culture)

الطبقة المغذية (الخلايا الحاضنة): طبقة من الخلايا الغير نشطة أما بمعاملاتها بالأشعة أو ببعض الكيماويات، تستخدم لتغذية خلايا أخرى. وتكون تلك الخلايا الحاضنة ملائمة للبيئة وتوضع فوقها الخلايا أو الأنسجة الأخرى مباشرة أو فوق حاجز عبارة عن ورقة ترشيح.

Filter sterilization

التعقيم بالمرشحات: عملية تعقيم المحاليل عن طريق ترشيحها بمرشحات بها ثقوب دقيقة تمنع مرور الكائنات الدقيقة.

Gametoclone

المستعمرات النباتية المستولدة من الجاميطات

Gametoclonal variation

التباين الجاميطي: التباين في الطرز المظهري للنباتات المستولدة من الجاميطات سواء كان هذا التباين مورث أو غير مورث.

Genetic engineering

الهندسة الوراثية: تقنية معملية تسمح تحويل الكائن وراثياً بإدخال جين أو أكثر إلى نواة الخلية لإكسابها صفة أو صفات جديدة تورث للنسل.

Genotype

الطرز الوراثي: التركيب الوراثي للفرد والناتج من الكروموسومات التي توجد بنواة الخلية.

Gibberellins

الجبريلينات: وهي مجموعة من منظمات النمو تشجع نمو وانقسام الخلايا وهناك العديد منها.

Growth regulators

منظمات النمو : مواد عضوية غير مغذية تؤثر وبكميات منخفضة للغاية في النمو التكاثر والتضاعف. وتضم عدة أقسام منها الأكسينات، السيتوكينينات، الإثيلين الخ.

Habituation

ظاهرة قد تحدث بعد فترة من زراعة الخلايا حيث بقدرتها على النمو دون الحاجة لإنسافة منظمات نمو خارجية.

Harding off

التقسية: عملية الأقامة التدريجية للنباتات الناتجة من زراعة الأنسجة للظروف الطبيعية.

Haploid

الفرد الأحادي: وجود نسخة واحدة من كروموسوم مميز للنوع في الخلية.

Heterotrophic

غير ذاتي التغذية: احتياج الكائن إلى إضافة سكر خارجي باستعمال مواد عضوية.

Heterokaryon

تعدد الانوية الخليط: ظاهرة احتواء الخلية على أكثر من نواة مختلفة الأب نتيجة دمج البروتوبلاست.

Homokaryon

تعدد الانوية الذاتي: ظاهرة احتواء الخلية على أكثر من نواة لنفس الأب نتيجة دمج البروتوبلاست.

Hormone

الهرمون: مركب عضوي يخلق في جزء محدد من النبات وبتراكيزات منخفضة للغاية يشجع أو يثبط النمو غالباً في مكان غير مكان تخليقه. (أنظر Growth regulators)

Hybridization

التهجين: أى طريقة يتكون عنها فرد هجين (فرد ناتج من أبوين غير متشابهين وراثياً)

Hyperhydration (Vitrification)

التميو الزجاجي: عبارة عن ظاهرة غير مرغوبة في زراعة الأنسجة النباتية قد حيث تأخذ الأنسجة مظهراً عصارياً زجاجياً شفافاً بعض الشيء وتكون هشة سهلة الكسر وتفقد القدرة على النمو الطبيعي

Inoculation

التلقيح: وضع الجزء النباتي أو الخلايا في أو على بيئة الزراعة في مزارع الأنسجة.

Intergeneric

التهجين بين الأجناس: الهجين متكون من جنسين مختلفين

Interspecific

التهجين بين الأنواع: هجين متكون من نوعين مختلفين.

Isoenzymes

مشابهات الإنزيم: صور جزيئية مختلفة من الإنزيم لكن لها نفس فعل الإنزيم.

Juvenile phase

مرحلة الشباب: هي الفترة من عمر النبات التي لا يمكن فيها تكوين أزهار وفي هذه الفترة يكون للنبات صفات ظاهرية أو فسيولوجية محددة ومختلفة عن النبات البالغ. ولا يستجيب النبات في تلك المرحلة إلى محفزات الإزهار.

Laminar air flow

كابينة تدفق الهواء: تستخدم في المعامل لإجراء العمل تحت ظروف هواء معقم مثل زراعة الأنسجة. ويتدفق الهواء بمروره خلال مرشحات دقيقة.

Meristem

الميرستيم: عبارة عن مجموعة من الخلايا الصغيرة نشيطة الانقسام ينتج عنها في مرحلة لاحقة تكوين عضو محدد. وفي النباتات الكامل توجد المناطق الميرستيمية العالية التخصص غالبا في قمم السوق والجذور.

Meristem culture

زراعة القمم الميرستيمية: هي زراعة القمة الميرستيمية المفصولة من قمة الساق ونسبة القبة وطولها لا يزيد عن ٠.١ مم

Meristemoid

عقدة من الخلايا غير الميرستيمية غير المتكشفة تتكون في مزارع الكالس ويتكون منها عضو عرضي.

Mesophyll cells

خلايا الميزوفيل: عبارة عن خلايا خضراء ذات قدرة على البناء الضوئي توجد بين طبقتي البشرة العليا والسفلى في الورقة. هذه الخلايا غير متكشفة نسبيا وغالبا يكون لها القدرة على الارتداد إلى الحالة الميرستيمية والانقسام.

Micrografting

التطعيم الدقيق: تركيب قمة نامية على ساق حديث النمو في القوارير.

Micronjection

الحقن الدقيق: إدخال جزء من الحامض النووي أو الجين إلى الخلية باستعمال أنبوبة زجاجية دقيقة للغاية (أقل من ميكرومتر).

Minimum inoculation density

أقل كثافة للخلايا المنزرعة: كثافة الخلايا التي إذا قلت عنها لن تتمكن الخلايا من النمو والانقسام في البيئة الجديدة.

Morphogenesis

التميز: سلسلة من العمليات الفسيولوجية والتشريحية في الكائن منوط بها نمو وتطور العضو النباتي أو تكوين عضو جديد.

Mutation

الطفرة: حدوث تغير مفاجئ يورث في الطرز الوراثي بسبب تغيير ثابت في المادة الوراثية.

Organ culture

زراعة الأعضاء: بحيث يحافظ على نموه وتطوره الطبيعي زمنها مزارع الجذور و مزارع قمم السيقان ومزارع الأجنة.

Organogenesis

التعضون: تكوين عضو من الكالس أو الخلايا المنزرعة.

Osmotic potential

الجهد الأسموزي: هو الضغط الناتج من ذوبان مادة في المذيب مثلاً إذابة ١ مول من الجلوكوز في لتر من الماء يؤدي إلى ضغط اسموزي مقداره ٢٢.٤ ضغط جوي.

pH

الرقم الهيدروجيني: هو اللوغاريتم السالب لتركيز أيونات الهيدروجين في الوسط.

Photoperiod

الفترة الضوئية: عدد ساعات الإضاءة التي يتعرض لها النبات أو المزرعة بالتبادل مع عدد ساعات الإظلام.

Phytohormone

الهرمون النباتي: هو مجموعة منظمات النمو الطبيعية في النبات.

Plating efficiency

كفاءة الزراعة: نسبة عدد الخلايا أو البروتوبلاست الذي تمكن من الانقسام وتكوين كالس عقب الزراعة.

Ploidy

التضاعف: تضاعف عدد الكروموسومات المميز للخلية. ويرمز للخلايا الأحادية بـ n والثنائية $2n$ والرابعة $4n$ وهكذا.

Polysaccharide

عديدة السكر: مجموعة من الكربوهيدرات تتكون من عديد من الوحدات المختلفة من السكر.

Population density

كثافة العشيرة: عدد الخلايا بوحدة المساحة أو الحجم لوعاء الزراعة. أو عدد الخلايا بوحدة الحجم من بيئة الزراعة في المعلق الخلوي.

Proliferation

تكاثر: التضاعف السريع للوحدات الجديدة (خلايا، أو أعضاء، أو الأجنة)

Protocorn

البرتوكورن: تحتوى بذور الأوركيد على جنين غير كامل التكوين يتألف من عدة منات من الخلايا. وعند الإنبات أو عند زراعة الأنسجة الخضرية يلاحظ تكوين تركيب شبيه بالدرنات يتكون منه النبات الكامل.

Protoplast

البروتوبلاست: هو الخلية منزوعة الجدار الخلوي.

Protoplast fusion

دمج البروتوبلاست: تقنية دمج البروتوبلاست المتشابه أو المختلف مع بعضه لتكوين هجين جسدي.

Rejuvenation

إعادة الصب: الارتداد من الحالة البالغة إلى حالة الصب.

Regeneration

الإستيلاد: وهو تطور الكالس أو الخلايا أو البروتوبلاست المنزوع إلى نبات كامل أو عضو أو خلية.

Shoot tip

قمة الساق: الجزء الطرفي من الساق بطول ٢-٥ سم تقريباً والمحتوى على القمة الميرستيمية وبعض الأوراق وجزء من الساق.

Single-node culture

زراعة العقد الساقية: زراعة جزء من الساق يحتوى على برعم واحد.

Somaclonal variation

التباين الوراثي الجسدي: التباين الوراثي في النباتات أو الخلايا الناتجة من زراعة الأنسجة.

Somatic embryo

الجنين الجسدي: هو تركيب يشبه الجنين الجنسي لكنه ينشأ من خلايا جسدية.

Somatic hybrid

الهجين الجسدي: هجين ينشأ من دمج خلايا غير جنسية.

Subculture

إعادة الاستزراع: نقل الخلايا أو النسيج أو العضو أو النبات من بيئة إلى أخرى.

Synthetic seeds

البذور المصنعة: تغليف الجنين الجسدي أو العقد الساقية أو القمم النامية بغلاف يحميها من الضرر أثناء التداول والزراعة حتى تنبت بطريقة تشبه البذرة العادية.

Totipotent cell

القدرة على التكاثر: يطلق هذا المصطلح على الخلايا النديّة دون الحيوانية حيث للخلية القدرة الوراثية على أن تتحول إلى نبات كامل.

Undifferentiated tissue

النسيج غير المتكشّف: هو الخلايا التي لا تظهر صفات تخصصية محددة كأن تكون أوعية خشب أو لحاء أو جذور مثلاً. لكن يجب استعمال هذا المصطلح بحذر حيث أن بعض الخلايا التي تبدو وكأنها غير متخصصة تقوم بتخليق مركب معين.

Vitrification

التجميد الزجاجي: عبارة عن ظاهرة غير مرغوبة في زراعة الأنسجة النباتية قد حيث تأخذ الأنسجة مظهراً عصارياً زجاجياً شفافاً بعض الشيء وتكون هشة سهلة الكسر وتفقد القدرة على النمو الطبيعي.

